

**8-AMINO - 5-ÄTHYL - 3-OXIDO - 6-PHENYL-
PHENANTHRIDINIUM-BETAIN
EIN NEUES SOLVATOCHROMES MOLEKÜL**

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde der
Fakultät für Chemie und Pharmazie der
Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg i. Br.

vorgelegt von
Johann - Henrich Finkentey
aus Wuppertal

1980

**8-AMINO - 5-ÄTHYL - 3-OXIDO - 6-PHENYL-
PHENANTHRIDINIUM-BETAIN
EIN NEUES SOLVATOCHROMES MOLEKÜL**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der
Fakultät für Chemie und Pharmazie der
Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg i. Br.

vorgelegt von
Johann - Henrich Finkentey
aus Wuppertal

1980

Dekan:	Professor Dr. G. Wegner
Leiter der Arbeit:	Professor Dr. H.W.Zimmermann
Referent:	Professor Dr. H.W.Zimmermann
Korreferent:	Professor Dr. Th. Ackermann

Tag der Bekanntgabe des Prüfungsergebnisses: 17.4.1980



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 1977 bis Dezember 1979 am Institut für Physikalische Chemie I der Universität Freiburg im Breisgau ausgeführt.

Danken möchte ich

Herrn Prof. Dr. Herbert W. Zimmermann für seine Sorge um die materiellen Voraussetzungen dieser Arbeit und für seine Anleitung, die immer darauf ausgerichtet war, mir Möglichkeiten zu eröffnen, nie mir Ziele oder Wege vorzuschreiben.

Herrn Prof. Dr. Hans Fritz und Herrn Dr. Dieter Hunkler für die abgebildeten NMR-Spektren und noch einige mehr.

Herrn Dr. Ernst F. Sturm für die Messung von Massenspektren.

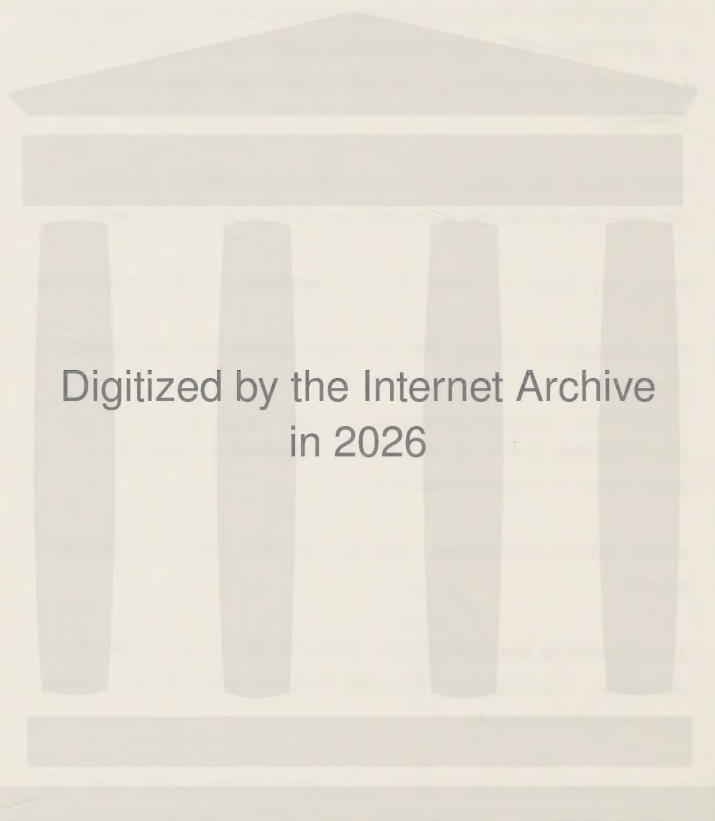
Frau Annemarie Naujok für die Experimente zur biologischen Färbung.

Herrn Thomas Berthold und Herrn Jean-René Grèzes für ihre stete Hilfsbereitschaft.

allen Institutskollegen, die mir mit Rat und Tat geholfen haben.

der Deutschen Forschungsgemeinschaft für finanzielle Unterstützung, dem Rechenzentrum der Universität für die Gewährung von Rechenzeit.

Herr Dr. Wolfgang Seiffert hat sich ausdrücklich jeden Dank für seine Hilfe verbeten. Ich bin froh und stolz, ihn zu meinen Freunden zählen zu dürfen.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543110_0003

INHALT

1.	Einleitung und Problemstellung	1
2.	Chemischer Teil	5
2.1.	Darstellung des Betains B	5
2.1.1.	Wahl des Synthesewegs	5
2.1.2.	Synthese des Phenanthridingerüsts	6
2.1.3.	Synthese von Ethidiumbromid	7
2.1.4.	Ersatz der 3-Amino-Gruppe durch die Hydroxy-Gruppe	9
2.1.5.	Reinigung des Betains B	11
2.2.	Untersuchungen zur Struktur des Betains B	13
2.2.1.	Das ^1H -NMR-Spektrum des Betains B	13
2.2.2.	Das Massenspektrum des Betains B	18
2.3.	Die Elektronenspektren des Betains B in Wasser bei verschiedenen pH-Werten	21
2.3.1.	Gültigkeit des Lambert-Beer'schen-Gesetzes	21
2.3.2.	Der pK_a -Wert des Betains B	22
2.4.	Zur Solvatochromie des Betains B	27
2.4.1.	Zum Verständnis der Solvatochromie	27
2.4.2.	Experimentelle Ergebnisse zur Solvatochromie des Betains B	28
2.5.	Zur Frage des H/D-Austauschs	34
2.6.	Ein Versuch zur Synthese des Betains A	38
3.	Physikalischer Teil	41
3.1.	Quantenmechanische Modellrechnungen	41
3.1.1.	Problemstellung	41
3.1.2.	Das Verfahren von Hartree und Fock	41
3.1.3.	Das Verfahren von Roothaan und Hall	42
3.1.4.	Die All-Valenz-Elektronen-Näherung	44
3.1.5.	Die CNDO-Näherung	44
3.1.6.	Wahl der Parameter	49
3.1.7.	Die Konfigurationswechselwirkung (CI)	52
3.1.8.	Ergebnisse der Modellrechnungen	53

3.2.	Zur Polarisationsgradspektroskopie	59
3.2.1.	Grundlagen des Verfahrens	
3.2.2.	Begriffe und Gleichungen	59
3.2.3.	Meßanordnung	61
3.3.	Experimentelle und berechnete Spektren des Betains B und des Dikations D	63
3.3.1.	Die Protonierungsgleichgewichte in Äthanol	63
3.3.2.	Spektren des Betains B	65
3.3.3.	Spektren des Dikations D	68
4.	Anwendung des Betains B in der biologischen Färbung	72
5.	Experimenteller Teil	74
5.1.	Chemische Verbindungen	74
5.2.	Lösungsmittel	78
5.3.	pH-Messungen	79
5.4.	Messung der Absorptionsspektren	79
5.5.	NMR-Spektrometer	79
5.6.	Messung des Massenspektrums	81
6.	Zusammenfassung	81
7.	Literaturverzeichnis	83

1. Einleitung und Problemstellung

Phenanthridinderivate sind schon seit längerer Zeit als therapeutisch wirksame Substanzen bekannt /1,2/. Ihre Hauptanwendung fanden sie als Trypanocide /3,4/. Eine Reihe von Arbeiten aus den Jahren vor 1950 klärte, an welche Strukturelemente die Aktivität gegen Trypanosomen geknüpft ist, welche sie verstärken oder vermindern /5-9/.

Eine der hochwirksamen Verbindungen ist der Farbstoff Ethidiumbromid, EB. Ethidiumbromid wurde darüber hinaus wegen seiner Bindung

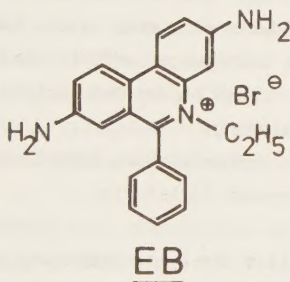


ABBILDUNG 1

Strukturformel von Ethidiumbromid

an DNA eingehend untersucht /10-20/. Die nicht-kompetitive Bindung wird im allgemeinen als Intercalation gedeutet /21,22/, die kompetitive Bindung beruht auf elektrostatischer Wechselwirkung und Wasserstoffbrückenbindung /23-27/. In einigen neuen Arbeiten sind Derivate des Ethidiumbromids mit dem Ziel untersucht worden, die Strukturelemente zu erkennen, die für die Bindung des Farbstoffs an DNA verantwortlich sind.

Vergleicht man die Ergebnisse dieser Arbeiten mit denen, die bei der Untersuchung der Phenanthridinderivate im Hinblick auf ihre trypanocide Aktivität erhalten wurden, findet man eine ausgeprägte Parallelität von pharmakologischer Wirksamkeit und Bindungsstärke, besonders der Intercalation. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf den ursächlichen Zusammenhang beider Phänomene, wie er schon früher vermutet worden ist /13/.

Auch in Cytologie und Histologie wird Ethidiumbromid angewandt. Es ist ein sehr gutes Fluorochrom zur Darstellung des Zellkerns. Dies nutzt man unter anderem in der Cytofluorometrie aus /29/.

Für die biologische Färbung wäre ein Farbstoff wünschenswert, der verschiedene Zellbestandteile unterschiedlich färbt. Im Rahmen eines vereinfachenden Modells wäre eine solche ideale Färbung zu verwirklichen, wenn zwei Bedingungen erfüllt sind:

1. Jeder Zellbestandteil bindet den Farbstoff durch eine andere Wechselwirkung.
2. Mit der Art der Wechselwirkung ändert sich auch die Farbe des gebundenen Farbstoffs.

In der Natur wird vor allem die erste Bedingung nicht zu erfüllen sein. Färbung von Zellbestandteilen bedeutet Färbung von Makromolekülen. Diese organisieren ihre Überstruktur mittels mehrerer Wechselwirkungsarten, die dann natürlich auch dem Farbstoff gegenüber wirksam werden.

Wir können also nicht erwarten, vom gebundenen Farbstoff Antwort auf die Frage zu erhalten, welche Wechselwirkung stattfindet und welche nicht. Dies ist die falsche Frage. Die angemessene Fragestellung heißt: Welche Wechselwirkungen tragen mehr oder weniger zur Bindung bei?

Die Wechselwirkungen können elektrostatischer Natur sein, sie können auf Richt-, Induktions- und Dispersionskräften, auf Wasserstoffbrückenbindungen und auf der Bildung von Elektronendonator-Akzeptor-Komplexen beruhen.

Alle diese Kräfte und Effekte gehen auch in die Vorstellung von der Polarität eines Lösungsmittels ein. Schon seit einiger Zeit ordnet man Lösungsmittel gemäß ihrer Polarität in Polaritätsreihen. Als Maß der Polarität verwendet man die Farbe, genauer die Lage des längstwelligen Absorptionsmaximums im Elektronenspektrum gelöster solvatochromer Moleküle /30-32/. Der Farbstoff dient als Sonde zur Erforschung der Eigenschaften seiner Umgebung.

Um dasselbe Prinzip auf die histologische Färbung von Zellen anzuwenden, soll ein geeigneter Farbstoff synthetisiert werden. Er soll möglichst weitgehend die Eigenschaften von Ethidiumbromid besitzen und außerdem einen ausgeprägten solvatochromen Effekt zeigen.

Bekanntlich sind große Solvatochromieeffekte für Moleküle zu erwarten, die im Grundzustand ein großes Dipolmoment haben, das sich bei Anregung stark ändert /33-35/. Untersuchungen an Mero-cyaninen /30,36/, Pyridinio-phenolaten /32,37/ und 4-Äthyl-10-oxido-benzo(f)chinolinium-betain /38/ bestätigen diese Überlegung.

Ersetzen wir formal eine Aminogruppe des Ethidiumbromids durch eine Oxidogruppe, erhalten wir die folgenden Betainstrukturen:

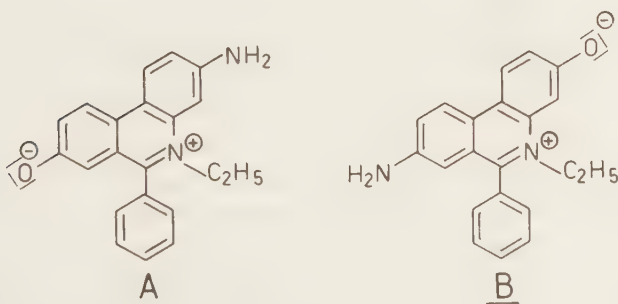


ABBILDUNG 2

Strukturformeln von Betain B und Betain A

Es handelt sich um das 8-Amino-5-äthyl-3-oxido-6-phenyl-phenanthridinium-betain, hier Betain B genannt, und ein Isomeres, das 3-Amino-5-äthyl-8-oxido-6-phenyl-phenanthridinium-betain, Betain A. Die Darstellung beider Verbindungen ist bislang nicht gelungen, obwohl sie versucht wurde /39/.

Für beide Moleküle können wir große Dipolmomente erwarten. Für das Betain A läßt sich nicht einmal eine chinoide Grenzstruktur angeben. Die Geometrie des Ethidumbromids, die für die Inter-calation wichtig ist, bleibt weitgehend erhalten. Die Wirksamkeit trypanocider Phenanthridinderivate wird von der Umwandlung einer Aminogruppe in eine phenolische Hydroxygruppe wenig beein-flußt /39/. Ist die Bindung an DNA wirklich für die pharmakolo-gische Aktivität trypanocider Phenanthridinderivate verant-wortlich, haben wir Grund zu hoffen, daß diese Betaine und die ihnen zugeordneten Phenole die erwünschten Eigenschaften besitzen.

In der vorliegenden Arbeit wird über die Darstellung und Reini-gung des Betains B berichtet. Seine Struktur wird durch Elemen-taranalyse, NMR-Spektrum und Massenspektrum gesichert. Seine Elektronenspektren in Wasser bei verschiedenen pH-Werten und in verschiedenen organischen Lösungsmitteln bei Raumtemperatur wer-den mitgeteilt. Über ein Experiment zur Deuterierung des Betains B wird berichtet.

Die Elektronenspektren des Betains B und des zugehörigen Dikat-ions werden mit einem All-Valenz-Elektronen-CNDO-CI-Verfahren berechnet. Die berechneten Spektren werden mit experimentellen Absorptions-, Emissions- und Polarisationsgradspektren ver-glichen, die bei der Temperatur des flüssigen Stickstoffs in glasartig erstarrtem Äthanol aufgenommen wurden.

Die Synthese des Betains A ist noch nicht gelungen. Es wird dis-kutiert, warum das Betain A nicht analog zur Darstellung des Betains B hergestellt werden kann und welche anderen Synthese-wege Erfolg versprechen.

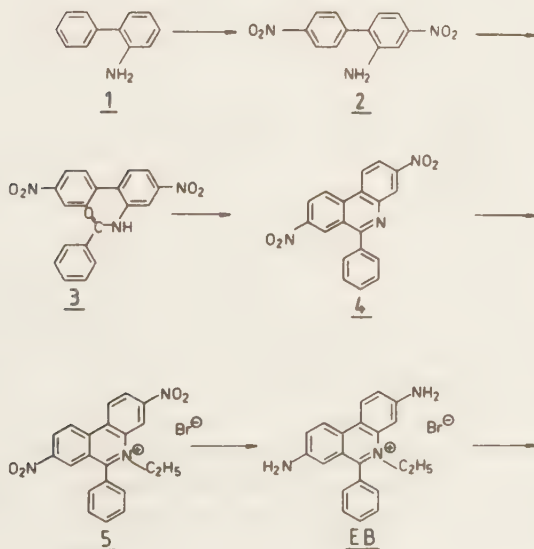
2. Chemischer Teil

2.1. Darstellung des Betains B

2.1.1. Wahl des Synthesewegs

Von den verschiedenen in der Literatur beschriebenen Phenanthridinsynthesen /40,41/ bietet sich die Cyclisierung von o-Acyl-amino-biphenylen zur Darstellung der 6-Alkyl- oder 6-Aryl-phenanthridine besonders an. Deshalb wurde zur Synthese des Betains B der in Abbildung 3 skizzierte Weg gewählt.

Er ist in drei wesentliche Etappen gegliedert, nämlich die Synthese des Phenanthridingerüsts, die Synthese von Ethidiumbromid und den Ersatz der Aminogruppe durch die phenolische Hydroxygruppe.



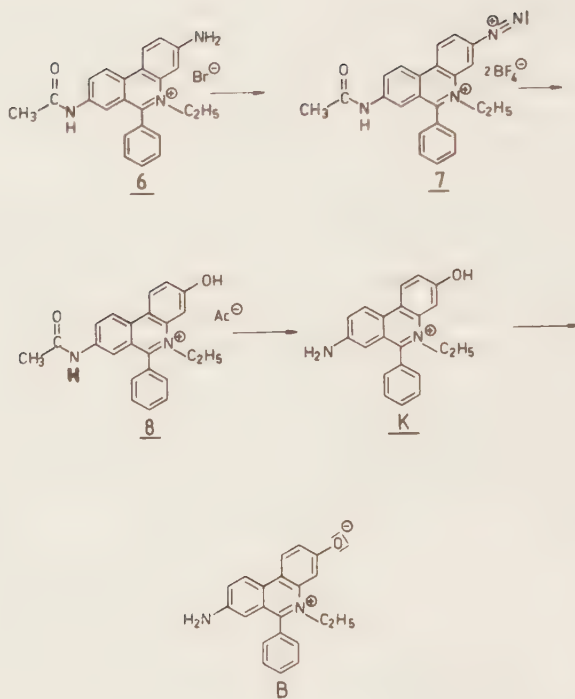


ABBILDUNG 3

Übersicht über die Darstellung des Betains B

2.1.2. Synthese des Phenanthridingerüsts

2-Amino-biphenyl 1 wird in konzentrierter Schwefelsäure durch 2 Mole Kaliumnitrat zweifach nitriert. Das Produkt ist 2-Amino-4,4'-dinitro-biphenyl 2 /42/.

Die Aminogruppe kann in der üblichen Weise mit Benzoylchlorid acyliert werden /43/. In siedendem Nitrobenzol geht das 2-Benz-amido-4,4'-dinitro-biphenyl 3 eine intramolekulare Friedel-Crafts-Acylierung ein, die das 3,8-Dinitro-6-phenyl-phenanthri-

din 4 liefert /44/. Die Reaktion erinnert an die Isochinolin-Synthese nach Bischler und Napieralski.

Wir haben das Phenanthridin 4 noch auf einem zweiten Weg hergestellt, der bessere Ausbeuten liefert. Er ist für die Synthese in technischem Maßstab entwickelt worden und erspart die Isolierung der Verbindung 3 /45/. 2 reagiert mit Benzotrichlorid in Nitrobenzol bei Gegenwart von Zinn-(IV)-chlorid zum Phenanthridin 4. Die Reaktion verläuft über ein Amidin und ein Imin der folgenden Strukturen:

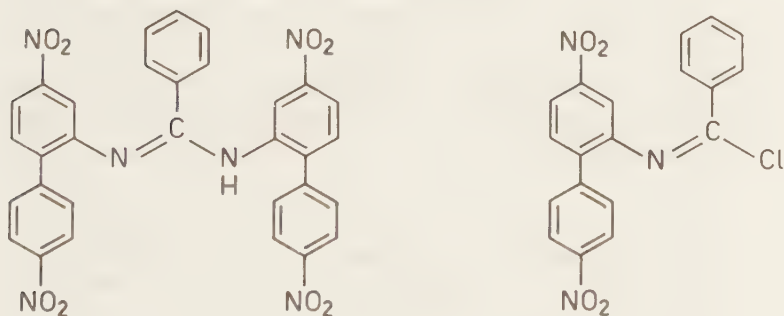


ABBILDUNG 4

Isolierbare Zwischenstufen bei der Phenanthridinsynthese nach /45/

2.1.3. Synthese von Ethidiumbromid

In 6-Stellung substituierte Phenanthridine lassen sich ähnlich leicht methylieren wie die unsubstituierten Verbindungen /46/. Die Quaternisierung mit größeren Gruppen ergibt aus sterischen Gründen nur mäßige Ausbeuten, die von der Art des Substituenten in 6-Stellung nur wenig abhängen /47/. Auch durch die Wahl des Alkylierungsmittels läßt sich das Verhältnis Salz/Base im Gleich-

gewicht nicht beeinflussen: Wir haben mit Diäthylsulfat, Fluor-schwefelsäureäthylester /48/ und Triäthylxonium-tetrafluoroborat /49/ in Chlorbenzol gleiche Ausbeuten erhalten.

Die besten Ergebnisse erhält man, wenn das Alkylierungsmittel zugleich Lösungsmittel ist. Geeignet sind Diäthylsulfat /50/ und p-Toluolsulfonsäure-äthylester /51/.

Die Konzentration an quartärem Salz durchläuft nach etwa 4 Stunden ein Maximum. Die aus dem Alkylierungsmittel freigesetzte Säure beschleunigt die Zersetzung des Alkylierungsmittels, und sie entzieht ihm durch Protonierung den Reaktionspartner. Die für die Reaktion notwendige Temperatur ist so hoch, daß auch der Abbau des quartären Salzes schon möglich ist. Er macht sich um so deutlicher bemerkbar, je mehr quartäres Salz schon gebildet worden ist. Am besten bricht man deshalb die Reaktion nach der angegebenen Zeit ab /51/.

Das quartäre Salz 5 liegt in einem pH-abhängigen Gleichgewicht mit seiner Pseudobase 9 vor; diese läßt sich mit Diäthyläther aus dem alkalisierten Reaktionsgemisch extrahieren, während nicht umgesetzte Base zurückbleibt. Beim Ansäuern der ätherischen Phase fällt das quartäre Salz 5 aus.

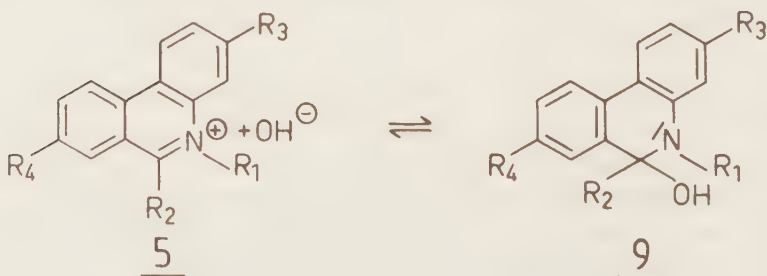


ABBILDUNG 5

Das Gleichgewicht zwischen Phenanthridiniumsalz und Pseudobase

Die Reduktion der Nitrogruppen gelingt katalytisch mit Wasserstoff bei 25 atü über Engelhard-Katalysator (Pd auf Aktivkohle) mit Äthanol als Lösungsmittel. Das entstehende 3,8-Diamino-5-äthyl-6-phenyl-phenanthridinium-bromid ist als Ethidiumbromid bekannt.

2.1.4. Ersatz der 3-Amino-Gruppe durch die Hydroxy-Gruppe

Die Aminogruppen des Ethidiumbromids lassen sich chemisch unterscheiden. Wird bei der Umsetzung von EB mit Acetanhydrid in Wasser Raumtemperatur nicht überschritten, bildet sich fast ausschließlich die 8-Acetamidoverbindung 6 /52/.

Die Darstellung von Phenolen durch Kochen wässriger Lösungen diazotierter aromatischer Amine ist ein übliches Verfahren /53/. Hier führt es nicht zum Erfolg. Nimmt man eine Probe des Reaktionsgemisches, alkalisiert sie und schüttelt mit Chloroform aus, so zeigt sich zwar die tiefblaue Farbe, die das Betain B in diesem Lösungsmittel annimmt. Untersucht man aber die Zusammensetzung des Gemisches dünn-schichtchromatographisch, erkennt man wenigstens 6 verschiedene Substanzen. Die Unterschiede der R_f -Werte sind so gering, daß eine Trennung selbst mit der präparativen Dünnschichtchromatographie nicht möglich erscheint. An den Größenverhältnissen der Flecke ist zu sehen, daß der Anteil an Betain B im Gemisch sehr gering ist. Die Hauptreaktion besteht in der Bildung von Teer, der als dunkelbrauner Fleck am Startpunkt zurück bleibt. Der Befund ist unabhängig davon, ob man die gekühlten Diazoniumsalzlösungen langsam erwärmt oder ob man sie tropfenweise in siedendes Wasser gibt.

Die Teerbildung ist eine häufige Nebenreaktion bei der Verkochung von Diazoniumsalzen zu Phenolen. Als aktivierte Aromaten sind Phenole gute Partnermoleküle für eine Azokupplung. Diese Reaktion ist nur möglich, wenn Phenol und Diazoniumkation gleichzeitig in der Lösung vorhanden sind.

Kleinere Phenole sind oft wasserdampf­flüchtig. Dann läßt sich die Nebenreaktion vermeiden, wenn man das gebildete Phenol durch Wasserdampfdestillation so schnell entfernt, wie man Diazoniumsalzlösung zutropft /54/. Erwartungsgemäß sind aber die Verbindung 8 und das Kation K, das unter den Bedingungen der Reaktion teilweise schon entsteht, nicht wasserdampf­flüchtig.

Bestimmte 4-Amino-chinoline werden zugänglich, wenn man nicht in wässriger Lösung, sondern in Trifluoressigsäure diazotiert /55/. In einigen Arbeiten wird über die Isolierung von Diazoniumtetrafluoroboraten berichtet, die anschließend entweder in wässriger Schwefelsäure und in Gegenwart von Kupferionen oder in Trifluoressigsäure und in Gegenwart von Kalium-trifluoracetat zersetzt werden /56,57/.

Die Synthese von Phenolestern durch Umsetzung von Diazoniumsalzen mit reinen Carbonsäuren ist seit längerem bekannt /58/. Die Phenolesterbildung ist offensichtlich der Vorteil der Varianten, bei denen wasserfrei gearbeitet wird. Weil Estergruppen den aromatischen Kern desaktivieren, findet die Azokupplung nicht statt.

Die Isolierung des Diazoniumtetrafluoroborats bietet die Möglichkeit, das Lösungsmittel zu wechseln, und ist ein zusätzlicher Reinigungsschritt.

Das folgende Verfahren, das sich an die beschriebenen Methoden anlehnt, erweist sich als geeignet zur Darstellung des Betains B: Das Amin 6 wird in wässriger, schwefelsaurer Lösung wie üblich diazotiert. Fügt man der kalten Diazoniumsalzlösung eine ebenfalls kalte Lösung von Natriumtetrafluoroborat hinzu, fällt die Verbindung 7 als feiner rotbrauner Niederschlag aus. Er wird abfiltriert, mit Wasser und mit Äther gewaschen, dann an der Luft getrocknet.

Die Umsetzung des Diazoniumsalzes 7 zum Phenolester geschieht in siedendem Eisessig, der zugleich eine äquimolare Menge von Na-

triumacetat enthält. Wollte man das Phenol 8 isolieren, müßte man den Phenolester alkalisch spalten, um vollständigen Umsatz zu erreichen. Wir haben darauf verzichtet, um nicht mehr als nötig Salze zu produzieren, die das Betain B adsorbieren könnten.

Die Aminogruppe wird auf die übliche Weise durch Spaltung des Säureamids in Salzsäure freigesetzt /52/.

Unter dem Einfluß von Base entsteht das 8-Amino-5-äthyl-3-oxido-6-phenyl-phenanthridinium-betain, Betain B, das mit Chloroform aus der wässrigen Phase extrahiert werden kann. Die organische Phase wird getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft. Das Betain B fällt schwarz-glänzend aus. Die Substanz ist noch nicht dünnschichtchromatographisch einheitlich.

2.1.5. Reinigung des Betains B

Wir haben zunächst versucht, das Betain B direkt zu reinigen. Es ist nicht gelungen, auf Kieselgel- oder Aluminiumoxid-Schichten mit neutralen oder basischen Laufmittelsystemen gute Trennungen zu erzielen.

Durch Säulenchromatographie erhält man reines Betain B, wenn man zunächst basisches Aluminiumoxid, dann Kieselgel als stationäre Phase verwendet. In beiden Arbeitsgängen dient Methanol als Laufmittel. Auf beiden Trägern wandert das Betain B nur sehr langsam, so daß der Aufwand an Zeit und Lösungsmittel außerordentlich groß ist.

Deshalb ist Reinigung auf der Stufe des Kations K schneller, selbst wenn hierbei wieder die Umwandlung des Kations K in das Betain B durch die beschriebene Extraktion mit Chloroform nötig wird. Als stationäre Phase verwandten wir Kieselgel, als mobile ein Gemisch aus n-Butanol, Wasser und Eisessig. Die Trennung mit diesem System ist sehr scharf und diente uns als Reinheitskriterium. Das Kation K läuft schneller als die Verunreinigungen

und hat den günstigen R_f -Wert 0,5. Die präparative Dünnschichtchromatographie liefert hier keine besseren Ergebnisse als die Säulenchromatographie. Zwar gehen auf der Säule die Zone des Kations K und die der nächstschnelleren Verbindung noch eben ineinander über, während sie auf der Dünnschichtplatte deutlich abgesetzt sind, die Farbunterschiede sind jedoch so ausgeprägt, daß die Fraktionierung nicht schwer fällt.

Das Betain B läßt sich wie beschrieben wiedergewinnen. Die Substanz ist nun dünnschichtchromatographisch einheitlich, enthält aber noch Lösungsmittel. NMR-spektroskopisch wurden n-Butanol und Wasser nachgewiesen. Gießt man eine gesättigte Lösung des Betains B in das zweihundertfache Volumen trockenen Diäthyläthers, fällt das Betain B als blaue, feinkristalline und alkoholfreie Substanz aus. Nach sorgfältigem Trocknen im Hochvakuum enthält das Betain B entsprechend der Elementaranalyse zwei Moleküle Kristallwasser.

2.2. Untersuchungen zur Struktur des Betains B

2.2.1. Das ^1H -NMR-Spektrum des Betains B

Die Abbildungen 7 und 8 zeigen das ^1H -NMR-Spektrum des Betains B in perdeuteriertem Dimethylsulfoxid, aufgenommen mit einem 360-MHz-Spektrometer. Als interner Standard diente Tetramethylsilan (TMS). Im folgenden wird die δ -Skala verwandt. In Tabelle 1 sind die chemischen Verschiebungen und die Kopplungskonstanten wiedergegeben. Die Bezeichnung der Protonen richtet sich nach Abbildung 6.

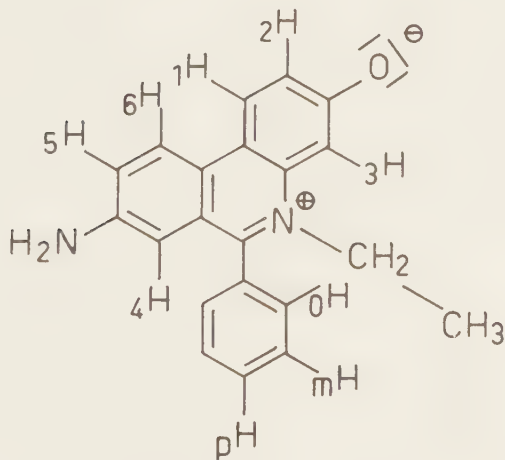


ABBILDUNG 6

Zur Diskussion der NMR-Spektren: Die Bezeichnung der Protonen

Auf Seite 14:

ABBILDUNG 7

Das ^1H -NMR-Spektrum des Betains B in DMSO-d_6

ABBILDUNG 8

Vergrößerte Ausschnitte aus dem in Abbildung 7 wiedergegebenen Spektrum

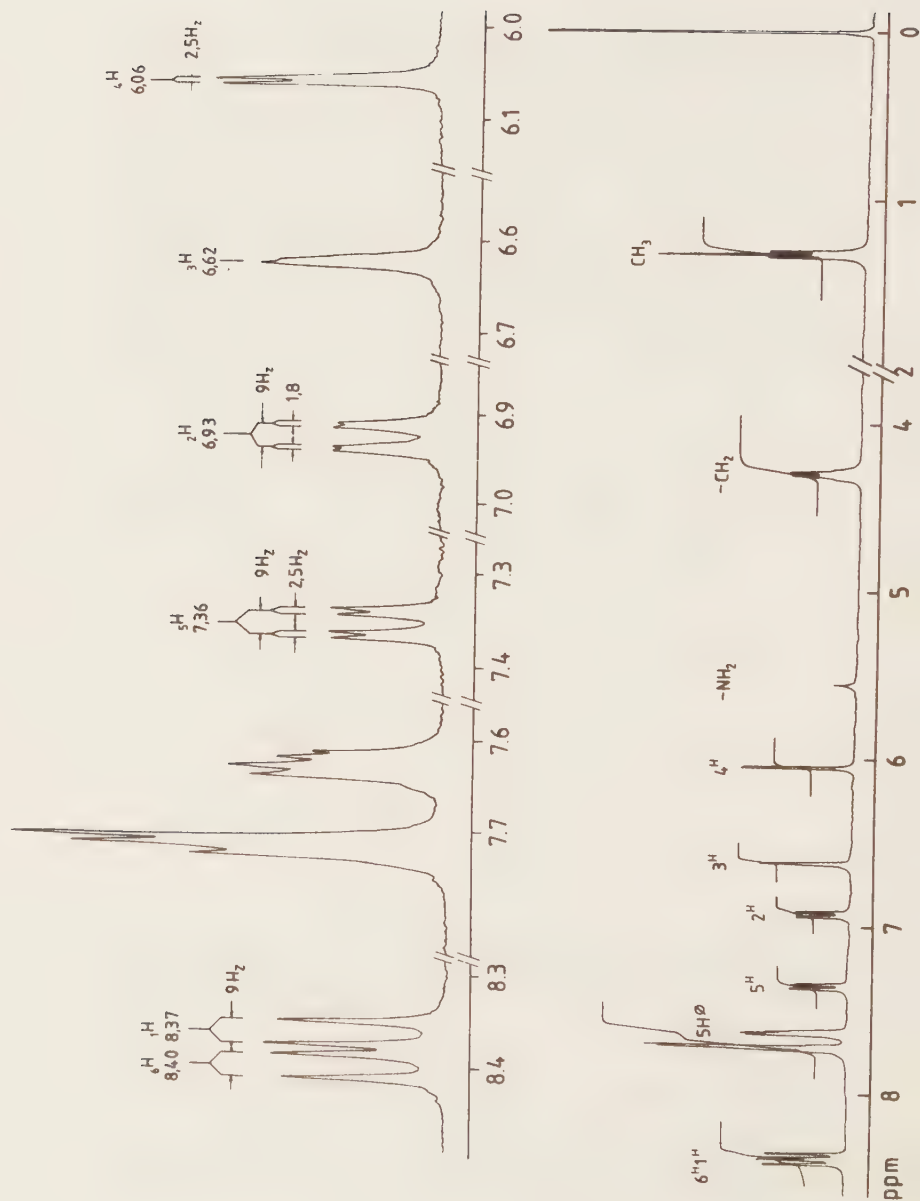


TABELLE 1

Chemische Verschiebungen und Kopplungs-
konstanten der Protonen des Betains B

Proton	δ (ppm)	i,j	J (i,j)
1	8,37	1,2	9
2	6,93	2,3	1,8
3	6,62		
4	6,06	4,5	2,5
5	7,36	5,6	9
6	8,40		
o	7,63		
m,p	7,72		
-CH ₂	4,31		
-CH ₃	1,32		
-NH ₂	5,57		

Die Resonanzen der Protonen 1 und 6 beobachtet man bei 8,37 ppm und 8,40 ppm. Sie sind eng benachbart, weil sich der induktive Effekt der Oxido- bzw. Aminogruppe kaum über drei Bindungen auswirkt und der mesomere Effekt die m-Stellung wenig beeinflusst. Es sind die beiden höchsten chemischen Verschiebungen des Spektrums, weil die Abschirmung der Protonen 1 und 6 durch die Ringströme dreier aromatischer Kerne besonders stark vermindert wird. Die Kopplungskonstanten für die Kopplung zwischen den Protonen 1 und 2 sowie 5 und 6 betragen 9 Hz.

Die Signale der Protonen 2 und 5 erscheinen bei 6,93 ppm und 7,36 ppm. Im vergrößerten Spektrum sieht man neben der gerade erwähnten o-Kopplung von 9 Hz die Aufspaltungen, die durch die Protonen 3 und 4 hervorgerufen werden. Für die Kopplung der Protonen 4 und 5 ergeben sich 2,5 Hz, für die der Protonen 2 und 3 1,8 Hz. Das Signal des Protons 2 ist gegenüber dem des Protons 5 nach hohem Feld verschoben, weil von den beiden Substituenten in o-Position der negative Sauerstoff einen größeren mesomeren Effekt hat als die Aminogruppe.

Bei 6,62 ppm ist das Signal des Protons 3 zu sehen. Die Aufspaltung durch Kopplung mit 2 ist nur angedeutet; darauf soll weiter unten eingegangen werden.

Die Resonanz bei 6,06 ppm ist dem Proton 4 zuzuordnen. Das Signal liegt bei relativ hohem Feld am Ende des Bereichs, der für aromatische Protonen zu erwarten ist. Verantwortlich dafür ist der Einfluß des Phenylrings. Wenn die Ebenen des Phenanthridingerüsts und des Phenylrings um etwa 90° gegeneinander geneigt sind, liegt das Proton 4 über dem Phenylring. Jetzt wird das äußere Feld von dem Sekundärfeld geschwächt, das durch den induzierten Ringstrom entsteht. Auch an diesem Signal ist wieder die Kopplung der Protonen 4 und 5 zu erkennen.

Ein zusätzliches Kriterium für die Zuordnung der Protonen am Phenanthridingerüst ist die Halbwertsbreite der Signale. Die Rotation der Äthylgruppe verändert in geringem Ausmaß das örtliche Magnetfeld mit der Zeit. Für das NMR-Experiment ist die mittlere Resonanzfrequenz maßgebend. Daraus folgt eine Signalverbreiterung. Die Rotation der Äthylgruppe wirkt sich auf den Ring, der den Sauerstoff trägt, viel stärker und besonders auf das Proton 3 aus. Die getroffene Zuordnung wird durch diese Überlegung gestützt.

Die Protonen des Phenylrings zeigen Signale bei 7,63 ppm (o) und 7,72 ppm (m,p).

Den Methylprotonen ist das Triplet bei 1,32 ppm zuzuordnen. Der Schwerpunkt des Quartettsignals, das die Methylenprotonen anzeigt, liegt bei 4,31 ppm. Es ist gegenüber dem Signal von Protonen einer Methylengruppe, die an eine Methylgruppe und an eine sekundäre Aminogruppe gebunden ist, deutlich in Richtung tiefen Felds verschoben. Solche Protonen erzeugen Signale zwischen 2,27 ppm und 2,63 ppm /59/. Außerdem sind Methyl- und Methylensignal signifikant verbreitert. Die verminderte Abschirmung der Methylenprotonen beruht darauf, daß der positi-

vierte Aza-Stickstoff seinen Elektronenmangel zu kompensieren sucht. Die Verbreiterung der Protonensignale einer Alkylgruppe, die an ein positiviertes Stickstoffatom gebunden ist, beobachtet man auch bei Cyaninen /60/.

Das Signal der Protonen der Aminogruppe bei 5,57 ppm ist scharf.

Das ^1H -NMR-Spektrum liefert auch einen Hinweis zur Elektronenstruktur des Betains B. B kann durch eine polare und eine chinoide Grenzstruktur beschrieben werden, wie sie in Abbildung 9 dargestellt sind.

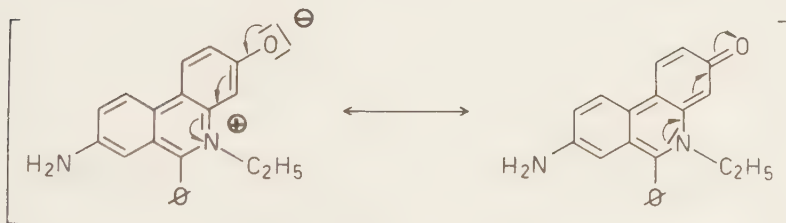


ABBILDUNG 9

Polare und chinoide Grenzstruktur des Betains B

Je nachdem, wie groß der Anteil der Grenzstrukturen am Grundzustand des Moleküls ist, wird man B entweder als Betain oder als Phenanthridon charakterisieren. Dem Spektrum ist zu entnehmen, daß die Elektronenverteilung eher die Bezeichnung Betain rechtfertigt, die wir von Anfang an verwandt haben. Die chemische Verschiebung des 1-Signals, seine Nähe zum 6-Signal und der Wert der Kopplungskonstanten für die 1,2- bzw. 5,6-Kopplungen sprechen für die Ausdehnung des aromatischen Systems über alle drei Ringe und gegen lokalisierte Doppelbindungen. Das Signal des Protons 2 zeigt, daß der o-Substituent einen starken positiven mesomeren Effekt ausübt und eine hohe Elektronendichte besitzt. Der Vergleich der chemischen Verschiebungen der Protonen 2 und 5 läßt schließen, daß der mesomere Effekt größer

als der einer Aminogruppe ist. All dies deutet auf den Oxido-Substituenten. In Korrelation zur Lokalisierung einer großen negativen Partialladung am Sauerstoff steht die Lokalisierung einer positiven Ladung am Aza-Stickstoff, die sich in der Lage des Signals der Methylenprotonen widerspiegelt.

Für die später zu beschreibenden quantenmechanischen Modellrechnungen ist die Kenntnis der Atomkoordinaten notwendig. Der Lage des Signals des Protons 4 ist zu entnehmen, daß die Ebenen des Phenanthridingerüsts und des Phenylrings um etwa 90° gegeneinander geneigt sind. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit Untersuchungen an Ethidiumbromid /61-63/.

2.2.2. Das Massenspektrum des Betains B

Abbildung 10 zeigt das Massenspektrum des Betains B, gemessen bei 200°C und einer Elektronenenergie von 70 eV. Der Basepeak des Spektrums liegt bei $m/e = 314$. Der Vergleich der gemessenen mit den berechneten relativen Intensitäten von Basepeak und den um eine oder zwei Einheiten größeren Isotopenpeaks soll Auskunft darüber geben, ob der Basepeak auch als Molekülionpeak anzusehen ist.

Das Betain B hat die Summenformel $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}$ und damit das Molekulargewicht 314 g/mol. Die theoretischen Intensitäten der Peaks bei 315 und 316 relativ zum Peak bei 314 lassen sich nach den bekannten Regeln aus der Summenformel und den natürlichen Isotopenhäufigkeiten der Elemente berechnen /59/. In Tabelle 2 sind berechnete und experimentelle Werte einander gegenübergestellt.

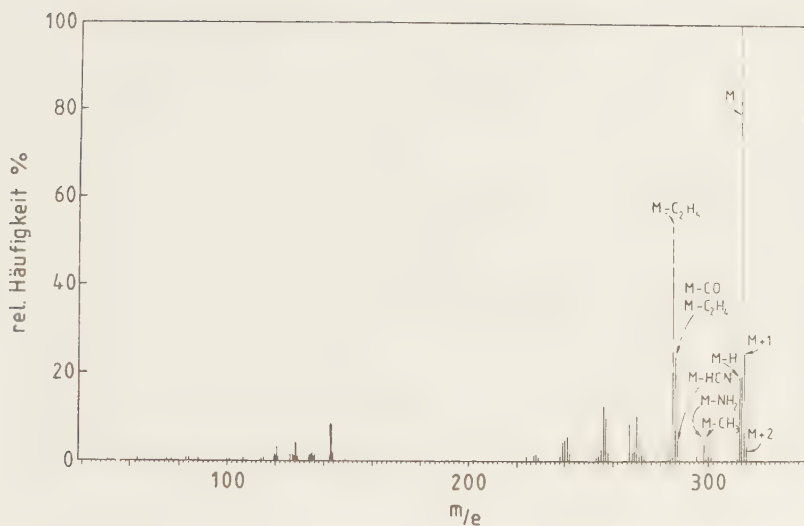


ABBILDUNG 10

Das Massenspektrum des Betains B

TABELLE 2

Experimentelle und berechnete Intensitäten
von Molekül- und Isotopenpeaks

m/e	experimentelle I.(%)	berechnete I.(%)
314	100,00	100,00
315	24,29	23,77
316	4,29	5,20

Die Übereinstimmung ist sehr gut. Damit sind Summenformel und Molekulargewicht gesichert.

Ohne Untersuchung der Fragmentierungsmechanismen können nur wenige Peaks zugeordnet werden. Diese sind charakteristisch für Strukturelemente des Betains B.

An aromatischen Aminen wird der Verlust von H, von NH_2 und von HCN beobachtet /64,65/. Diesen Zerfallswegen entsprechen die Peaks bei $m/e = 313$, $m/e = 298$ und $m/e = 287$.

Phenole und Chinone spalten leicht Kohlenmonoxid ab /66,67/. Auch das Betain B sollte diese Möglichkeit besitzen, die den Peak $m/e = 286$ erklärt.

Die Äthylgruppe kann als ganze abgespalten werden. Sie kann aber auch Äthylen freisetzen oder die Methylgruppe abspalten. Diesen Fragmentierungen entsprechen die Peaks bei $m/e = 285$, $m/e = 286$ und $m/e = 299$.

Ein intensiver Molekülpeak ist typisch für Heteroaromaten und alkylierte Heteroaromaten; im vorliegenden Spektrum ist es der Basepeak. Für stabile kondensierte aromatische Systeme ist das Auftreten doppelt geladener Ionen zu erwarten /68/; man findet sie hier im Massenbereich von 100 - 150.

Die wesentlichen Eigenschaften des Massenspektrums stehen mit der Struktur des Betains B in Übereinstimmung.

2.3. Die Elektronenspektren des Betains B in Wasser bei verschiedenen pH-Werten

2.3.1. Gültigkeit des Lambert-Beer'schen-Gesetzes

In Citrat-Borat-Phosphat-Pufferlösung /69/ bei pH = 9.0 ist das Absorptionsspektrum des Betains B im Bereich von 1×10^{-3} mol/l bis 2×10^{-5} mol/l von der Konzentration unabhängig.

Die Neigung zur Assoziation sollte beim insgesamt ungeladenen Betain B größer sein als beim Kation K. Man erkennt ohne weiteres, daß es für Moleküle des Betains B eine günstige Anordnung gibt, in der die Zwitterionen intermolekular wechselwirken können.

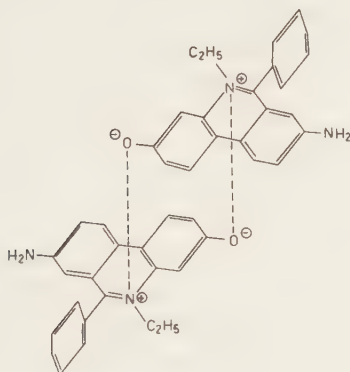


ABBILDUNG 11

Assoziationsmöglichkeit des Betains B

Wenn das Betain B im erwähnten Konzentrationsbereich nicht assoziiert, ist sichergestellt, daß bei den nachfolgend beschriebenen Messungen das Gleichgewicht zwischen B und K beobachtet wird und nicht etwa ein pH-abhängiges Assoziationsgleichgewicht.

2.3.2. Der pK_a -Wert des Betains B

Saure Lösungen des Betains B in Wasser sind gelb, basische purpurfarben. Spektrophotometrisch erkennt man im sauren Bereich mit steigender H^+ -Ionenkonzentration Veränderungen des Spektrums, die man mit bloßem Auge nicht wahrnimmt.

Mit dem Amino- und dem Oxidosubstituenten besitzt das Betain B zwei Gruppen, die protoniert werden können und so zu den verschieden absorbierenden Spezies führen. Der Vergleich der pK_a -Werte von Anilin ($pK_a = 4,63$) und Phenol ($pK_a = 9,89$) /70/ läßt erwarten, daß zunächst der Sauerstoff protoniert wird. Ohne weiteres ist allerdings nicht auszuschließen, daß in geringem Ausmaß auch der andere Prozeß abläuft.

Wir haben die Spektren des Betains B in Abhängigkeit vom pH-Wert gemessen. Oberhalb $pH = 9$ ändert sich das Spektrum praktisch nicht mehr. Die Spektren, die bei pH-Werten zwischen 4 und 9 aufgenommen werden, besitzen isosbestische Punkte bei 21750 cm^{-1} , 25500 cm^{-1} , und 35600 cm^{-1} und 40250 cm^{-1} . Drei dieser Spektren sind in Abbildung 12 wiedergegeben.

Damit sind drei Befunde sichergestellt:

1. Die einfache Protonierung des Betains B führt ausschließlich zu einer Molekülspezies. Insgesamt liegen dann nur zwei Gleichgewichte vor, eines zwischen Betain B und Kation K, das andere zwischen Kation K und Dikation D. Der Sachverhalt ist in Abbildung 13 dargestellt.
2. Die Gleichgewichtskonstanten der beiden Protonierungsstufen liegen genügend weit auseinander und können einzeln bestimmt werden.
3. Das Spektrum bei $pH = 4$ ist dem Kation K, das bei $pH = 9$ dem Betain B zuzuordnen.

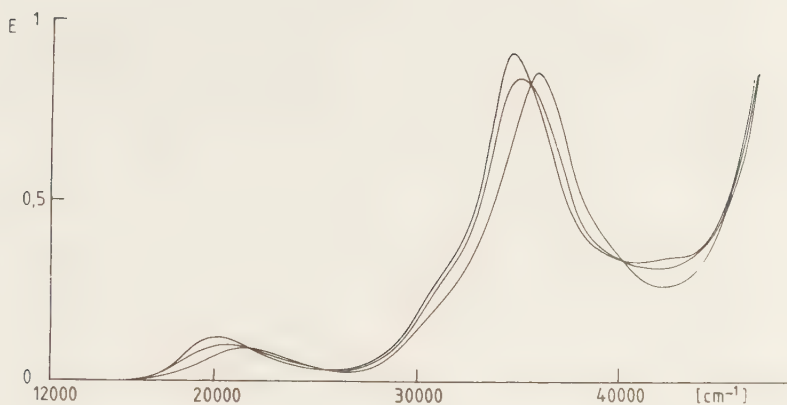


ABBILDUNG 12

Absorptionsspektren des Betains B in Citrat-Borat-Phosphat-Puffer bei den pH-Werten 6,6 , 7,6 und 8,2. Aufgetragen ist die Extinktion einer $2,52 \times 10^{-4}$ molaren Lösung gegen die Wellenzahl.

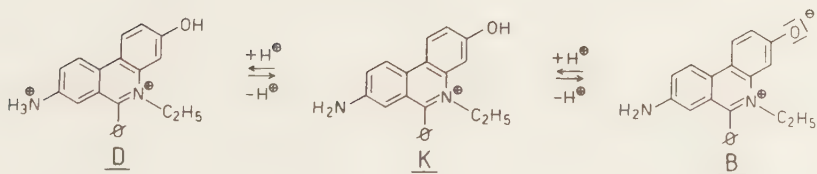


ABBILDUNG 13

Die Gleichgewichte zwischen Betain B, Kation K und Dikation D

Abbildung 14 zeigt die Spektren von Betain B und Kation K in Citrat-Borat-Phosphat-Puffer /69/. Das dritte Spektrum schreiben wir dem Dikation D zu. Es ist in 1 n Salzsäure aufgenommen; höhere Protonenkonzentrationen haben keinen Einfluß auf das Spektrum.

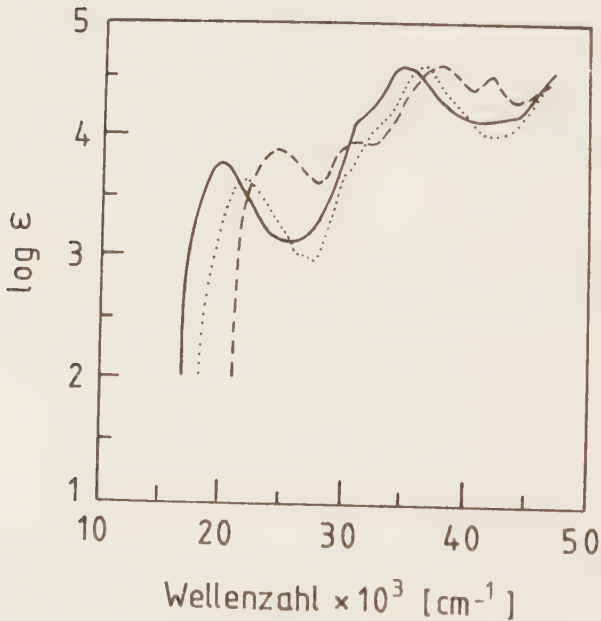


ABBILDUNG 14

Absorptionsspektren von Betain B (—), Kation K (...) und Dikation D (---) in CBP-Puffer. $c = 2,52 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$. Aufgetragen ist der Logarithmus des Extinktionskoeffizienten gegen die Wellenzahl.

Das längstwellige Absorptionsmaximum verschiebt sich mit zunehmender Protonierung von 20000 cm^{-1} (B) über 22000 cm^{-1} (K) nach 24500 cm^{-1} (D), das zweite, größte Maximum erfährt eine geringere kurzwellige Verschiebung von 34700 cm^{-1} (B) über 36300 cm^{-1} (K) nach 37900 cm^{-1} (D). Beim Dikation D sind zwei Banden (31000 cm^{-1} , 41800 cm^{-1}) ausgebildet, die beim Betain B und beim Kation K nur als Schultern zu erkennen sind.

Der pK_a -Wert für das Dissoziationsgleichgewicht $\text{K} \rightleftharpoons \text{B}$ bei 25°C wurde spektralphotometrisch bestimmt. Man verwendet die Formel

$$\text{pK}_a = \text{pH} + \lg \frac{E_B - E}{E - E_K} .$$

Hierin bedeuten E_B , E_K die Extinktionen des Betains und des Kations bei einer geeigneten analytischen Wellenzahl (19600 cm^{-1}). E ist die Extinktion des Gleichgewichtsgemischs beim jeweiligen pH-Wert. Die Formel gilt für den speziellen Fall konstanter Schichtdicke und konstanter Gesamtkonzentration ($d = 0,5\text{ cm}$; $c = 2,52 \times 10^{-4}\text{ mol/l}$). Man leitet sie her, indem man das MWG für die Dissoziation des Kations K auf die Form der Henderson-Hasselbalch'schen-Gleichung bringt und die Konzentrationen von B und K durch die Extinktionen ausdrückt. Eine genaue Beschreibung des Verfahrens und eine ausführliche Ableitung sind der Literatur zu entnehmen /71/.

Der pK_a -Wert beträgt $7,15 \pm 0,04$ bei 25°C . Die Fehlerbreite ist die einfache Standardabweichung. Eine graphische Auswertung der Messungen ist in Abbildung 15 zu sehen. Der pK -Wert ist durch den Schnittpunkt der Geraden mit der pH-Achse gegeben.

Im Hinblick auf die geplante Anwendung des Farbstoffs zur Zellfärbung ist der gefundene pK_a -Wert günstig. Bei physiologischem pH-Wert liegen Betain B und Kation K nebeneinander vor, so daß der Zelle zwei potentielle Wechselwirkungspartner angeboten wer-

den. Die Farben beider Spezies sind so gut zu unterscheiden, daß zu erkennen ist, welches Molekül gebunden wird.

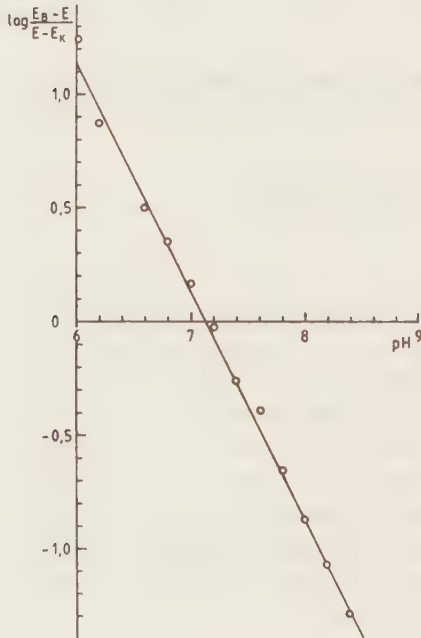


ABBILDUNG 15

Graphische Auswertung der Messungen zur Bestimmung des pK_a -Werts

2.4. Zur Solvatochromie des Betains B

2.4.1. Zum Verständnis der Solvatochromie

Lage, Intensität und Form der Elektronenbanden einer gelösten Substanz können vom Lösungsmittel abhängen. Dies Phänomen bezeichnet man als Solvatochromie.

Wird ein Molekül aus dem Gaszustand in ein Lösungsmittel überführt, tritt es mit den Lösungsmittelmolekülen in Wechselwirkung. Anstelle des isolierten Moleküls muß man jetzt den Komplex aus gelöstem Molekül und Solvathülle betrachten. Die Lage einer Elektronenbande hängt von den Solvatationsenergien des betrachteten Moleküls im elektronischen Grundzustand und im angeregten Zustand ab. Ändert sich die Differenz dieser Solvatationsenergien mit dem Lösungsmittel, beobachtet man Solvatochromie.

Frühe, auf qualitative Erklärung ausgerichtete Arbeiten führen den Einfluß des Lösungsmittels darauf zurück, daß es die Anteile der mesomeren Grenzstrukturen in den Elektronenzuständen des solvatochromen Moleküls ändere /72-74/. Zum quantitativen Verständnis des Effekts muß man das Lösungsmittel explizit in die Betrachtung einbeziehen und den Zusammenhang zwischen Solvatationsenergien und meßbaren Eigenschaften des gelösten Moleküls und des Lösungsmittels beschreiben.

Autoren, die vom Onsager'schen "cavity and reaction-field"-Modell /75/ ausgehen, betrachten das Lösungsmittel als homogenes, isotropes Dielektrikum, das durch die makroskopische Dielektrizitätskonstante charakterisiert ist; das gelöste Molekül wird durch Dipolmoment und Polarisierbarkeit gekennzeichnet /33-35,76,77/.

Andere Autoren verlassen die Kontinuumsvorstellung. Sie unterscheiden einen Nahordnungsbereich um das gelöste Molekül von den Bereichen, in denen die Struktur des Lösungsmittels unverändert bleibt. Der Nahordnungsbereich wird beschrieben, als ob es sich

dabei um ein einziges Teilchen, das "solvaton", handele. Im Solvaton sind alle Wechselwirkungen zwischen gelöstem Molekül und Lösungsmittel abgesättigt, es wirkt nach außen hin wie ein beliebiges Lösungsmittelmolekül /78,79/. Innerhalb dieser Theorie wird das Lösungsmittel durch die mikroskopische Dielektrizitätskonstante charakterisiert.

Ein dritter Ansatz bezieht sich ausschließlich auf unpolare Moleküle in unpolaren Lösungsmitteln. Dann treten nur Dispersionskräfte auf. Unter dieser Voraussetzung hängen die solvatochromen Effekte von den Polarisierbarkeiten der gelösten und der Lösungsmittelmoleküle sowie den Paarverteilungsfunktionen ab /80/.

2.4.2. Experimentelle Ergebnisse zur Solvatochromie des Betains B

Wir haben die Spektren des Betains B bei 25⁰ C in verschiedenen Lösungsmitteln gemessen. Im wesentlichen verschiebt sich das Spektrum als Ganzes, seine Struktur bleibt erhalten und die Extinktionskoeffizienten an den Absorptionsmaxima ändern sich wenig.

Im sichtbaren Bereich gibt es nur die deutlich abgesetzte Farbstoffbande ("1. Maximum" in Tabelle 3), der Extinktionskoeffizient liegt bei 6000. Die zweite Bande ("2. Maximum") liegt zwischen 32000 cm⁻¹ und 35000 cm⁻¹ und hat einen maximalen Extinktionskoeffizienten von etwa 50000. Im langwelligen Teil der Bande ist immer eine Schulter ("1. Schulter") zu erkennen; in einigen Lösungsmitteln kann man auch auf dem kurzwelligen Teil der Bande eine schwache Schulter ("2. Schulter") beobachten. Zwischen 41000 cm⁻¹ und 43000 cm⁻¹ zeigt das Betain B in manchen Lösungsmitteln eine weniger gut ausgeprägte Bande ("3. Maximum").

In Tabelle 3 sind die Daten zusammengestellt, soweit sie meßbar sind. Von der "2. Schulter" ist nur festgehalten, ob sie erscheint

TABELLE 3

Lage der Elektronenbanden des Betains B in verschiedenen Lösungsmitteln
Zahlenangaben in Wellenzahlen (cm^{-1}), Erläuterungen im Text

Lösungsmittel	DK	1. Maximum	1. Schulter	2. Maximum	2. Schulter	3. Maximum
Wasser	78,5	20000	29200	34700	nein	42700
Methanol	32,6	19100	30500	34400	nein	
Äthanol	24,3	18400	30300	33500	nein	42800
n-Propanol	20,1	18150	30200	33300	nein	42100
n-Butanol	17,1	18000	30100	33250	nein	42100
i-Propanol	18,3	17750	29400	33150	ja	41600
Äthylenglykolkolmond- methyläther		18500	29200	33600		
n-Heptanol		19600	31200	34200	ja	
n-Oktanol	10,3	18050	30300	33250	ja	41700
n-Nonanol		17800	30100	33100	ja	41400
Methylenchlorid	9,1	17150	29100	32400	ja	41300
Chloroform	4,7	17100	29400	32400	ja	41300
Acetonitril	37,5	16900	28500	32800	ja	41200
Dimethyleulfoxid	48,9	16300	28000	32200	ja	
N,N-Dimethyl- formamid	36,7	16300	28000	32250	ja	
Pyridin	12,3	16300	28000	32100		

oder nicht. Zusätzlich enthält die Tabelle die Dielektrizitätskonstanten der Lösungsmittel; die Werte stammen aus der Literatur /32,70/.

In Tabelle 3 sind so gebräuchliche Lösungsmittel wie Aceton, THF, Dioxan und Essigester nicht aufgeführt, weil die geringe Löslichkeit des Betains B die Messung der Spektren nicht zuläßt.

Die Bandenlagen korrelieren nicht mit der DK. Wir haben versucht, die molaren Übergangsenergien des Betains B mit denen des 2,6-Diphenyl-4-(2,4,6-triphenyl-1-pyridinio)-phenolats zu vergleichen, dessen molare Übergangsenergien in über 100 Lösungsmitteln gemessen wurden /32/. Ein erkennbarer Zusammenhang ist wohl deshalb nicht gegeben, weil die Phenylgruppen im Pyridinium-Betain die Ladungszentren weitaus stärker abschirmen, als dies im Betain B der Fall ist. Dadurch kommen gegenüber dem Betain B gerade die Wechselwirkungen besser zur Geltung, die ohnehin den größten Beitrag zur Solvatation leisten: Elektrostatische Wechselwirkung und Wasserstoffbrückenbindungen. Das Pyridinium-Betain wird auf die von seiner Umgebung angebotenen Wechselwirkungen weniger selektiv reagieren.

Die weitere Diskussion sei auf die längstwellige Bande beschränkt; die anderen Banden verschieben sich, von sehr wenigen Ausnahmen abgesehen, in gleicher Richtung, aber in geringerem Ausmaß.

Die im physikalischen Teil dieser Arbeit beschriebenen Modellrechnungen ergeben, daß das Übergangsmoment des längstwelligen Elektronenübergangs vom Sauerstoff auf den Aza-Stickstoff gerichtet ist. Man beobachtet eine Rotverschiebung beim Wechsel von Wasser zu einem weniger polaren Lösungsmittel. Das Dipolmoment ist demnach im Grundzustand größer als im angeregten Zustand.

Wie Tabelle 3 zu entnehmen ist, unterscheidet das Betain B Lösungsmittel zuerst danach, ob sie Wasserstoffbrückenbindungen eingehen können oder nicht. Ordnet man die Lösungsmittel nach fallender Wellenzahl des 1. Maximums und sieht einmal von Wasser und

n-Heptanol ab, ereignet sich die größte Rotverschiebung beim Übergang von i-Propanol zu Methylenchlorid. Innerhalb der Gruppe der hydroxylhaltigen Lösungsmittel ist die Rotverschiebung im allgemeinen geringer abgestuft.

Auffällig sind einige Besonderheiten. Bei den unverzweigten Alkoholen verschiebt sich das 1. Maximum nicht parallel zur Anzahl der Kohlenstoffatome. Monotone Verschiebung der Bande beobachtet man aber in der Reihe der C1- bis C4-Alkohole und der C7- bis C9-Alkohole.

Die Werte für Äthylenglykolmonomethyläther und Äthanol liegen außerordentlich dicht beieinander.

Die Spektren des Betains B in den nicht-hydroxylhaltigen Lösungsmitteln DMSO, DMF und Pyridin sind nahezu gleich.

Das Betain B unterscheidet amphiprotische und aprotische Lösungsmittel /81/. Die Abbildungen 16 und 17 zeigen Spektren des Betains B in je zwei Vertretern jeder Gruppe.

Auch ohne Spektrometer sieht man einer Lösung des Betains B sofort an, zu welcher Gruppe das Lösungsmittel gehört: Lösungen von B in amphiprotischen Solventien sind rot, in aprotischen Solventien blau.

Zur Dokumentation des ästhetischen Reizes, den die Skala der feinabgestuften Rot- und Blautöne ausübt, sollten die Meßkolben mit den verschiedenen Lösungen photographiert werden. Dabei zeigte sich, daß das Betain B in hydroxylhaltigen Lösungsmitteln gegen Licht beständig ist, während es in den anderen innerhalb weniger Minuten ausbleicht. DMSO bildet dabei eine Ausnahme, vielleicht wegen schwer zu entfernender Wasserreste.

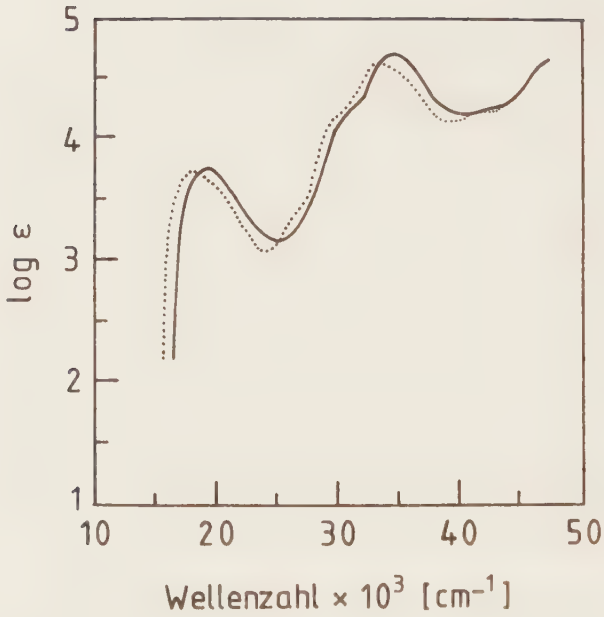


ABBILDUNG 16

Absorptionsspektren des Betains B bei 25° C

— in Methanol $c = 1,766 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$

... in n-Octanol $c = 1,506 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$

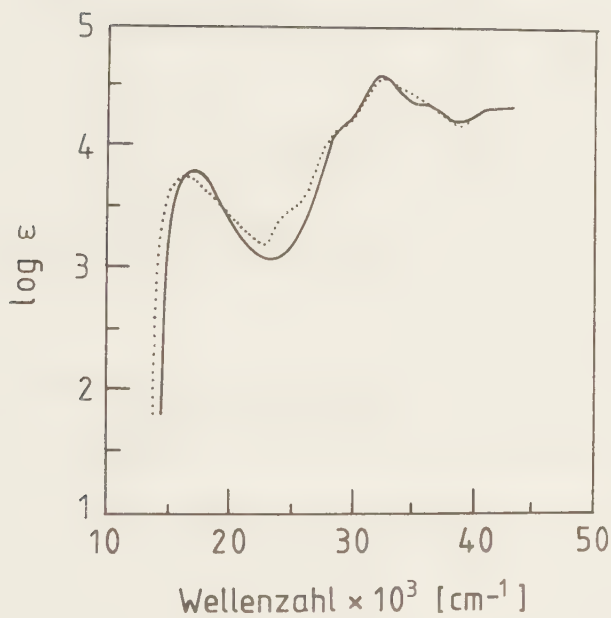


ABBILDUNG 17

Absorptionsspektren des Betains B bei 25° C

— in Chloroform $c = 1,506 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$

... in DMF $c = 1,178 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$

2.5. Zur Frage des H/D-Austauschs

Tetramethylethidiumbromid und andere aminosubstituierte Farbstoffe werden von Deuterotrifluoressigsäure am aromatischen Gerüst deuteriert /82/. Wir haben untersucht, ob das Betain B gleiches Verhalten zeigt.

Löst man das Betain B in Deuterotrifluoressigsäure, zeigt sich die gelbe Farbe, die Kation K und Dikation D besitzen. An einer solchen Lösung wurde das ^1H -NMR-Spektrum gemessen, das in Abbildung 18 wiedergegeben ist. Es ist wesentlich komplizierter als das des Betains B in DMSO- d_6 (Abb. 7). Nur einige Signale können zugeordnet werden. Die Bezifferung der Protonen richtet sich wieder nach Abbildung 6.

Eindeutig gehört das Triplettsignal bei 1,72 ppm zur Methylgruppe, das Quartett bei 4,96 ppm zur Methylengruppe. Diese Signale gestatten es, die Peakfläche für ein Proton zu bestimmen.

Die Signalgruppe bei etwa 9 ppm rührt von vier verschiedenen Protonen her. Die chemischen Verschiebungen sind 8,092 ppm, 9,015 ppm, 9,061 ppm und 9,117 ppm. Jedes Signal ist durch eine o-Kopplung von 9 Hz aufgespalten. Dadurch fallen zwei Linien bei 9,004 ppm zusammen, man sieht nur 7 Linien. Die Peakfläche entspricht jedoch insgesamt nur zwei Protonen. Die Signale müssen zu zwei verschiedenen Systemen gehören. Lage und Aufspaltungsmuster sprechen dafür, sie den Protonen 1 und 6 des Kations K und des Dikations D zuzuordnen. Eine weitere Präzisierung ist nicht möglich.

Die Signale bei 8,25 ppm und 8,37 ppm haben gleiche Peakflächen. Dadurch ist man zunächst versucht, sie zwei verschiedenen Protonen in einer Spezies zuzuordnen. Man findet jedoch unterschiedliche Flächen unter den Signalen, wenn man der Lösung einige Tropfen nicht deuterierter Trifluoressigsäure zufügt. Die Summe beider Flächen entspricht einem Proton. Die Signale, durch eine

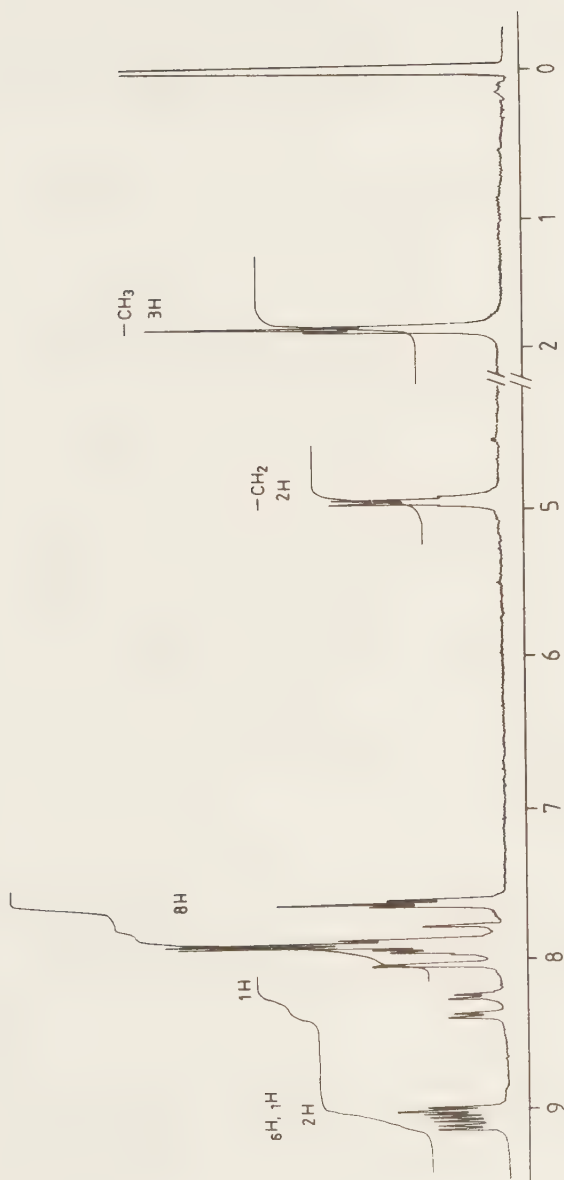


ABBILDUNG 18
 360 MHz- ${}^1\text{H}$ -NMR-Spektrum einer Lösung von Kation K und Dikation D in Deuteriofluoroessigsäure
 Erklärung im Text!

o-Kopplung von je 9 Hz aufgespalten, werden also von Protonen in zwei verschiedenen Molekülen hervorgerufen. Es sind entweder die Protonen 5 oder 2 in Kation K und Dikation D, die in gleicher Konzentration vorliegen, wie dem Flächenverhältnis zu entnehmen ist.

Zwischen 7,5 ppm und 8,1 ppm müssen nun noch die 5 Phenylprotonen, das Proton 2 (oder 5) und die Protonen 3 und 4 erscheinen. Das Integral zeigt auch 8 Protonen an.

Erwärmt man nun die Probe im Meßröhrchen eine halbe Stunde auf 50° C, läßt sie wieder abkühlen und nimmt das Spektrum ein zweites Mal auf, stellt man folgende Veränderungen fest: Das Signal bei 7,78 ppm ist verschwunden, und die Flächenverhältnisse der Signale bei 8,25 ppm und 8,37 ppm sowie der Signalgruppe oberhalb 9 ppm haben sich geändert.

Das Verschwinden des Signals bei 7,78 ppm kann nicht als Beweis für einen H-D-Austausch gelten. Denn die Integrationskurve zeigt noch immer 8 Protonen zwischen 7,5 ppm und 8,1 ppm an. Das Verschwinden des Signals muß damit zusammenhängen, daß sich das Verhältnis der Konzentrationen an Kation K und Dikation D verändert hat, wie man an den geänderten Flächenverhältnissen sieht. Die Gleichgewichtskonstante des gegebenen Systems kann nur von der Temperatur abhängen, diese ist aber bei beiden Experimenten gleich.

Die Befunde sprechen dafür, daß es sich um einen kinetischen Effekt handelt und das System wenigstens in einem Fall nicht im Gleichgewicht beobachtet wurde. Dies verdient festgehalten zu werden, denn Säure-Base-Reaktionen sind normalerweise besonders schnell.

Die geringe Geschwindigkeit der Protonenübertragung ist natürlich die Erklärung dafür, daß man die Signale entsprechender Protonen von Kation K und Dikation D im Bereich tiefen Felds

einzelnen sehen kann. Um so eher bleibt aber offen, warum nur jeweils ein Signal für die Methylprotonen und die Methylenprotonen erscheint und warum diese Signale eine so große Halbwertsbreite haben.

2.6. Ein Versuch zur Synthese des Betains A

Die zwei Aminogruppen im 4,4'-Diamino-2-nitro-biphenyl lassen sich einzeln schützen: Mit Acetanhydrid reagiert nur eine Aminogruppe, und es entsteht 4'-Acetamido-4-amino-2-nitro-biphenyl. Dies setzt man mit Chlorameisensäureäthylester zu 4'-Acetamido-4-carbäthoxyamino-2-nitro-biphenyl um. Während die Acetamido-gruppe schon in 2 n Salzsäure gespalten wird, gelingt die Freisetzung der Aminogruppe aus dem Kohlensäureamidester erst in halbkonzentrierter Schwefelsäure. Diese Versuche sind von Caldwell und Walls beschrieben worden /83/.

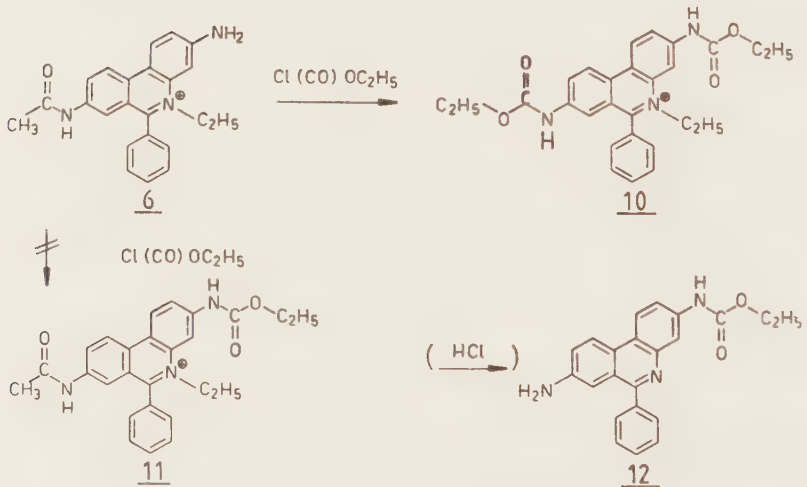


ABBILDUNG 19

Erwünschte und wirkliche Reaktion der Verbindung 6 mit Chlorameisensäureäthylester

Wir haben versucht, diese Reaktionsfolge auf Ethidiumbromid zu übertragen, um das Betain A, ausgehend von der Verbindung 12 in Abbildung 19, darzustellen. Dafür ist ein Weg denkbar analog dem, der in Kapitel 2.1.4. für die Synthese des Betains B, ausgehend von Verbindung 6, erläutert wurde.

Die Umsetzung von Verbindung 6 mit Chlorameisensäureäthylester liefert jedoch nicht das gewünschte Produkt 11, vielmehr wird die Acetylgruppe verdrängt. Das Produkt ist Dicarbäthoxy-ethidiumbromid 10, wie man durch das ^1H -NMR-Spektrum unschwer erkennt. Das Spektrum ist in Abbildung 20 wiedergegeben.

Das Molekül enthält drei Äthylgruppen; die Signale der Methylenprotonen erscheinen bei 1,38 ppm, 1,53 ppm und 1,75 ppm, die der Methylenprotonen bei 4,37 ppm, 4,47 ppm und 4,95 ppm.

Auf der Suche nach einem anderen Syntheseweg liegt nahe, die unterschiedlichen pK_a -Werte der Aminogruppen von Ethidiumbromid auszunutzen. Zunächst wird die 8-Aminogruppe ($\text{pK}_a = 2,42$) protoniert, dann die 3-Aminogruppe ($\text{pK}_a = 0,71$) /84/. Es hat sich jedoch gezeigt, daß die pK_a -Werte zu dicht beieinander liegen und auch bei streng kontrolliertem pH-Wert beide Aminogruppen diazotiert werden /85/.

Ein erfolgversprechender, aber langwieriger Weg zum Betain A ist folgender: Wie erwähnt ist das 4'-Acetamido-4-carbäthoxy-amino-2-nitro-biphenyl zugänglich /83/. Nach Reduktion der Nitrogruppe liegt ein 2-Amino-biphenyl-derivat vor, von dem aus man vermutlich auf die im Abschnitt 2.1. geschilderte Weise zur Verbindung 11 gelangen kann.

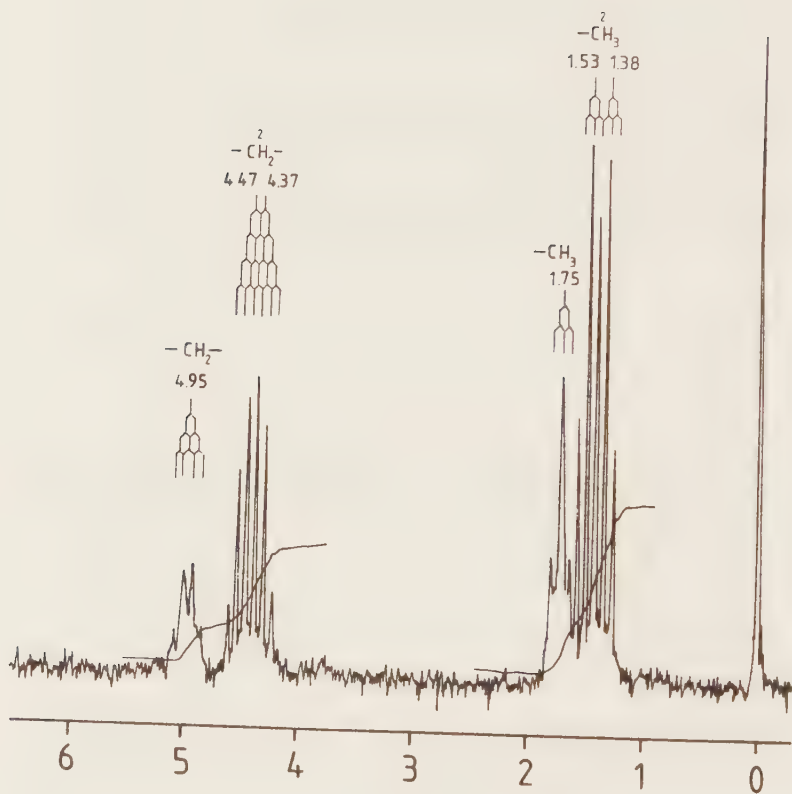


ABBILDUNG 20

90-MHz- ^1H -NMR-Spektrum von Dicarboäthoxy-ethidiumbromid 10
(Ausschnitt)

3. Physikalischer Teil

3.1. Quantenmechanische Modellrechnungen

3.1.1. Problemstellung

Die Elektronenspektren des Betains B und seiner protonierten Formen sollen näherungsweise quantenmechanisch berechnet werden. Das angewandte Verfahren geht auf Arbeiten von Pople, Santry und Segal zurück /86-88/. Eine besonders ausführliche Darstellung geben Pople und Beveridge /89/. Es ist ein SCF-Verfahren in CNDO-Näherung. Eine CI-Rechnung schließt sich an.

In diesem Kapitel wird über die Grundlagen des Verfahrens in wenigen Worten berichtet. Ausführlich soll auf die Näherungen eingegangen werden. Die Wahl der Parameter und die Ergebnisse werden am Schluß des Abschnitts beschrieben.

3.1.2. Das Verfahren von Hartree und Fock

Das SCF-Verfahren von Hartree und Fock /90/ geht aus vom All-Elektronen-Hamiltonoperator und von einer gegen Elektronenvertauschung antisymmetrischen Wellenfunktion, die Produkte von orthonormalen Molekülorbitalen enthält. Die Darstellung einer Wellenfunktion als Produkt von Einelektronenfunktionen ist nur sinnvoll, wenn der Hamiltonoperator als Summe von Einelektronenoperatoren dargestellt werden kann. Die Elektron-Elektron-Wechselwirkungsterme verhindern dies zunächst. Die Separation in ein System von Einelektronengleichungen gelingt, wenn statt der Wechselwirkung zwischen zwei Elektronen diejenige zwischen einem Elektron und der Ladungsverteilung berechnet wird, die von allen übrigen Elektronen erzeugt wird. Dazu werden ein Coulomboperator und ein Austauschoperator, beide Bestandteile des Hartree-Fock-

Operators, geeignet definiert. Der Hartree-Fock-Operator enthält nun die Molekülorbitale, die eigentlich erst bestimmt werden sollen. Operatoren und Funktionen werden deshalb gleichzeitig mit Hilfe des Variationsprinzips berechnet und in einem iterativen Prozeß verbessert. Aus frei gewählten Funktionen wird ein Hartree-Fock-Operator gebildet. Mit ihm werden verbesserte Funktionen berechnet, die zu einem verbesserten Hartree-Fock-Operator führen. Das Verfahren wird bis zur Selbstkonsistenz der Eigenfunktionen wiederholt. Die endgültige Ladungsverteilung ist damit unabhängig von der anfänglichen Wahl der Funktionen.

3.1.3. Das Verfahren von Roothaan und Hall

Die Hartree-Fock-Gleichungen sind ein System gekoppelter Differentialgleichungen, das geschlossen nicht lösbar ist. Die Molekülorbitale ψ_i können näherungsweise durch eine Linearkombination der Atomorbitale ϕ_ν dargestellt werden.

$$\psi_i = \sum_{\nu} c_{\nu i} \phi_{\nu} \quad (1)$$

Roothaan /91/ und Hall /92/ haben gezeigt, daß die SCF-Theorie mit diesem Ansatz für ein "closed-shell"-System endlich zu den Roothaan-Gleichungen führt:

$$\sum_{\nu} F_{\mu\nu} c_{\nu i} = \sum_{\nu} S_{\mu\nu} c_{\nu i} \epsilon_i \quad (2)$$

Darin bedeuten in atomaren Einheiten

$$F_{\mu\nu} = H_{\mu\nu} + G_{\mu\nu} \quad (3)$$

$$H_{\mu\nu} = \langle \tilde{\phi}_{\mu} | -\frac{1}{2} \Delta - \sum_A V_A(r) | \phi_{\nu} \rangle \quad (4)$$

$$G_{\mu\nu} = \sum_{\lambda\sigma} P_{\lambda\sigma} [J_{\mu\nu|\lambda\sigma} - \frac{1}{2} (\mu\sigma|\nu\lambda)] \quad (5)$$

$$(\mu\nu, \lambda\sigma) = \langle \bar{\psi}_{\mu}(1) \psi_{\nu}(1) | r_{12}^{-1} | \bar{\psi}_{\lambda}(2) \psi_{\sigma}(2) \rangle \quad (6)$$

$$S_{\mu\nu} = \langle \bar{\psi}_{\mu} | \psi_{\nu} \rangle \quad (7)$$

$$P_{\lambda\sigma} = 2 \sum_i^{\text{occ}} c_{i\lambda} c_{i\sigma} \quad (8)$$

ϵ_i ist die Orbitalenergie für das Molekülorbital ψ_i . Der Index i kennzeichnet Einelektronenmoleküzzustände, Indices in griechischen Buchstaben beziehen sich auf die Atomorbitale des Basis-satzes. Zahlen in Klammern unterscheiden Elektronen, große lateinische Buchstaben Atomkerne.

Die Matrixelemente $H_{\mu\nu}$ beschreiben die kinetische und die potentielle Energie eines Elektrons im Feld aller Kerne A . Die Elemente $G_{\mu\nu}$ stellen den Anteil der Energie dar, der von der Wechselwirkung der Elektronen herrührt. $P_{\lambda\sigma}$ ist die Ladungsdichtematrix. Zur Ladungsdichte tragen natürlich die Elektronen bei, nicht die Orbitale; deshalb ist die Summation nur über die besetzten Orbitale (occ) zu erstrecken.

Die Orbitalenergien ϵ_i , die als Ionisierungsenergien verstanden werden können, sind Lösungen der Säkulargleichung

$$|F_{\mu\nu} - \epsilon S_{\mu\nu}| = 0 \quad (9)$$

Die totale Elektronenenergie ist gegeben durch

$$E_E = \frac{1}{2} \sum_{\mu\nu} P_{\mu\nu} (H_{\mu\nu} + F_{\mu\nu}) \quad (10)$$

die Gesamtenergie für gegebene Kernabstände R

$$E = E_E + \sum_{A < B} Z_A Z_B / R_{AB} \quad (11)$$

Man findet Gleichung (2) auch in der Matrix-Schreibweise.

$$F C_i = (H + G) C_i = S C_i \epsilon_i \quad (12)$$

F , H , G und S sind Matrizen mit den Elementen $F_{\mu\nu}$, $H_{\mu\nu}$, $G_{\mu\nu}$ und $S_{\mu\nu}$, C_i ist der Spaltenvektor der Koeffizienten $c_{\nu i}$, ϵ_i ist als Energie eine skalare Größe.

Während innerhalb der Hartree-Fock-Theorie die Variationsrechnung zu einem System gekoppelter Differentialgleichungen führte, erhält man in der Roothaan-Hall-Theorie ein algebraisches lineares Gleichungssystem: Es werden nur noch die Koeffizienten $c_{\nu i}$ variiert.

3.1.4. Die All-Valenz-Elektronen-Näherung

Es ist nun näher zu spezifizieren, welche Atomorbitale in die Linearkombination nach Gleichung (1) eingehen. Wählt man nur die $2p_z$ -Funktionen aus, kommt man zu einer $\uparrow$ -Elektronentheorie. Im "all-valence-orbital"-Verfahren werden alle die Atomorbitale einbezogen, die zur selben Hauptquantenzahl gehören wie das oberste besetzte Orbital des isolierten Atoms. Dies sind also das $1s$ -Orbital für Wasserstoff, die $2s$ -, $2p_x$ -, $2p_y$ - und $2p_z$ -Orbitale für Kohlenstoff, Stickstoff und Sauerstoff. Das ist die erste Näherung, die in das Verfahren eingeht.

Die zweite Näherung bezieht sich auf die beiden $1s$ -Elektronen von Kohlenstoff, Stickstoff und Sauerstoff. Sie werden berücksichtigt, indem man die tatsächliche Ladung des Kerns um zwei Elementarladungen vermindert. In die Rechnung geht statt der wirklichen Ladung eine effektive Ladung ein.

3.1.5. Die CNDO-Näherung

Für große organische Moleküle ist die Zahl der zu berechnenden Integrale noch immer zu groß. Über die verschiedenen Näherungs-

methoden innerhalb der "all-valence-orbital"-Theorien geben Klopman und O'Leary /93/ eine knappe Übersicht.

Die Näherung des "complete neglect of differential overlap" /86-89/ liefert Ergebnisse, die von der Wahl des Koordinatensystems und der Hybridisierung der Atome unabhängig sind. Damit bleibt eine wesentliche Eigenschaft des ungekürzten Hartree-Fock-Verfahrens erhalten. Man nennt deshalb die CNDO-Näherung ein invariantes Verfahren.

Im einzelnen werden folgende Approximationen eingeführt:

1. Bei der Normierung der Molekülorbitale ψ_i werden die Atomorbitale ϕ_ν wie ein orthonormaler Satz behandelt. Die Überlappungsintegrale (7) gehorchen dann Gleichung (13):

$$S_{\mu\nu} = \delta_{\mu\nu} \quad (13)$$

Die Orthonormalitätsbedingung für die Molekülorbitale ψ_i nimmt die Form an:

$$\sum_{\mu} c_{\mu i} c_{\mu j} = \delta_{ij} \quad (14)$$

Dies ist die "zero-differential-overlap"-Näherung /94/. Gleichung (13) gilt für Atomorbitale ϕ_μ und ϕ_ν am selben Zentrum ohnehin streng, weil sie Funktionen zu verschiedenen Erwartungswerten sind. Man muß sich klarmachen, daß der ZDO-Ansatz nur bei der Normierung und bei der Formulierung der Säkular determinante (9) gemacht wird; in später erwähnten Größen haben solche Überlappungsintegrale einen von Null verschiedenen Wert.

2. Zweielektronen-Zweizentren-Austauschintegrale werden vernachlässigt. Das bedeutet in der Schreibweise von Gleichung (6):

$$(\mu\nu|\lambda\sigma) = 0 \quad ; \quad \text{außer } \mu=\nu \quad \text{und } \lambda=\sigma \quad (15)$$

Es verschwinden jedoch nicht die Zweizentren-Zweielektronen-Coulombintegrale:

$$(\mu\mu|\nu\nu) = \delta_{\mu\nu} \quad (16)$$

Aus Gründen der geforderten Invarianz wird dadurch die nächste Näherung notwendig. Eine genaue Begründung ist /86/ oder /89/ zu entnehmen.

3. Die Wechselwirkungintegrale $\delta_{\mu\nu}$ hängen nicht von der Art der Atomorbitale ϕ_μ und ϕ_ν ab, sondern nur von der Art der Atome A und B, zu denen die Orbitale gehören:

$$\delta_{\mu\nu} = \delta_{AB} \quad ; \quad \mu \text{ an A, } \nu \text{ an B} \quad (17)$$

Auf die Berechnung der δ_{AB} wird im Abschnitt über die Wahl der Parameter noch eingegangen.

Mit den bisherigen Näherungen vereinfachen sich die Matrixelemente $G_{\mu\nu}$. Mit den Gleichungen (13), (15) und (16) erhält man aus Gleichung (6):

$$G_{\mu\mu} = \frac{1}{2} P_{\mu\mu} \delta_{\mu\mu} + \sum_{\sigma \neq \mu} P_{\sigma\sigma} \delta_{\mu\sigma} \quad (18)$$

$$G_{\mu\nu} = -\frac{1}{2} P_{\mu\nu} \delta_{\mu\nu} \quad ; \quad \mu \neq \nu \quad (19)$$

Die Coulombintegrale $\delta_{\mu\mu}$ in Gleichung (18) enthalten Funktionen ϕ_μ und ϕ_ν , die entweder zu einem Zentrum oder zu zwei Zentren gehören. Durch Trennung dieser Terme unter Verwendung von Gleichung (17) erhält man aus Gleichung (18):

$$G_{\mu\mu} = -\frac{1}{2} P_{\mu\mu} \delta_{AA} + P_{AA} \delta_{AA} + \sum_{B \neq A} P_{BB} \delta_{AB} \quad ; \quad \mu \text{ an A} \quad (20)$$

Dabei ist P_{BB} die gesamte Valenzelektronendichte am Atom B.

$$P_{BB} = \sum_{\nu}^B P_{\nu\nu} \quad (21)$$

Nun sind noch zwei Näherungen einzuführen, die die Matrixelemente $H_{\mu\nu}$ betreffen. Zieht man aus der Summe in Gleichung (4) den Term heraus, der sich auf das Zentrum A bezieht, zu dem ϕ_μ gehört, erhält man für die Diagonalelemente:

$$\begin{aligned} H_{\mu\mu} &= (\mu | -\frac{1}{2}\Delta - V_A | \mu) - \sum_{B \neq A} (\mu | V_B | \mu) \\ &= U_{\mu\mu} - \sum_{B \neq A} (\mu | V_B | \mu) \quad ; \mu \text{ an A} \end{aligned} \quad (22)$$

$U_{\mu\mu}$ ist ein Maß für die Energie eines Elektrons im Orbital ϕ_μ am isolierten Kern A. Es hängt somit nur von der Natur des Atoms A ab und bietet sich für die empirische Parametrisierung an. Die anderen Terme in Gleichung (22) beschreiben die Wechselwirkung eines Elektrons im Orbital ϕ_μ am Atom A mit den anderen Kernen, die durch die Elektronen der inneren Schalen abgeschirmt sind. Hierfür wird später eine Näherung eingeführt.

4. In den Außerdiagonalelementen $H_{\mu\nu}$ können die Orbitale ϕ_μ und ϕ_ν zum selben Zentrum A oder zu verschiedenen Zentren A und B gehören. In Analogie zu Gleichung (22) erhält man im ersten Fall:

$$H_{\mu\nu} = U_{\mu\nu} - \sum_{B \neq A} (\mu | V_B | \nu) \quad ; \mu, \nu \text{ an A} \quad (23)$$

Wenn die Basisfunktionen s-, p-, ... Funktionen sind und keine Hybridorbitale, verschwinden die $U_{\mu\nu}$ aus Symmetriegründen. Die übrigen Terme beschreiben die Wechselwirkung der Verteilung $\phi_\mu \phi_\nu$ am Zentrum A mit den anderen Kernen. In Analogie zur Vernachlässigung der entsprechenden Elektron-Elektron-Terme (15) werden auch diese Ausdrücke nicht berücksichtigt, außer wenn $\mu = \nu$ ist. In diesem Fall gilt Gleichung (24):

$$(\mu | V_B | \mu) = V_{AB} \quad ; \mu \text{ an A} \quad (24)$$

Gleichung (24) ist schon in Gleichung (22) enthalten. Wieder hängen die Werte dieser Integrale nicht von der Art der Orbitale, sondern nur von der Natur der Atome ab. Das ist wie bei Näherung

3 in der Invarianzforderung begründet. Tatsächlich werden die Integrale V_{AB} nicht berechnet, sondern mit der Ladungszahl von B, Z_B , und den Elektronenabstoßungsintegralen χ_{AB} korreliert.

$$V_{AB} = Z_B \chi_{AB} \quad (25)$$

Eine genaue Begründung hierfür wird in /88/ gegeben; letztlich entscheidend sind die besseren Ergebnisse, die mit Verwendung von Gleichung (25) erhalten werden.

5. Die Außerdiagonalelemente $H_{\mu\nu}$, die Orbitale ψ_μ , ψ_ν zu verschiedenen Zentren enthalten, sind ein Maß für den Energiegewinn, der eintritt, wenn sich ein Elektron gleichzeitig im Feld zweier Kerne bewegt. Es sind Resonanzintegrale. Sie werden nicht explizit berechnet, sondern parametrisiert:

$$H_{\mu\nu} = \beta_{\mu\nu} = \beta_{AB}^0 S_{\mu\nu} ; \mu \text{ an A, } \nu \text{ an B} \quad (28)$$

Es ist naheliegend zu erwarten, daß $H_{\mu\nu}$ und $S_{\mu\nu}$ näherungsweise proportional sind. Wegen der Invarianzforderung hängt β_{AB}^0 nur von der Natur der beteiligten Atome und nicht vom Orbitaltyp ab. Es soll gelten:

$$\beta_{AB}^0 = \frac{1}{2} (\beta_A^0 + \beta_B^0) \quad (29)$$

Damit läßt sich die F-Matrix in der endgültigen Form angeben. Sie enthält die Elemente:

$$F_{\mu\mu} = U_{\mu\mu} + (P_{AA} - \frac{1}{2} P_{\mu\mu}) \chi_{AA} + \sum_{B \neq A} (P_{BB} - Z_B) \chi_{AB} \quad (30)$$

$$F_{\mu\nu} = \beta_{AB}^0 S_{\mu\nu} - \frac{1}{2} P_{\mu\nu} \chi_{AB} ; \mu \neq \nu \quad (31)$$

Gleichung (31) gilt auch, wenn ψ_μ und ψ_ν am selben Atom A definiert sind. Dann wird $S_{\mu\nu} = 0$ und $\chi_{AB} = \chi_{AA}$.

Die Gesamtenergie, gegeben durch Gleichung (11), läßt sich durch Einzentren- und Zweizentrenterme darstellen:

$$E = \sum_A E_A + \sum_{A < B} \sum E_{AB} \quad (32)$$

$$E_A = \sum_{\mu}^A P_{\mu\mu} U_{\mu\mu} + \frac{1}{2} \sum_{\mu}^A \sum_{\nu}^A (P_{\mu\mu} P_{\nu\nu} - \frac{1}{2} P_{\mu\nu}^2) \delta_{AA} \quad (33)$$

$$\begin{aligned} E_{AB} = & \sum_{\mu}^A \sum_{\nu}^B (2 P_{\mu\nu} \beta_{\mu\nu} - \frac{1}{2} P_{\mu\nu}^2) \delta_{AB} \\ & + (Z_A Z_B R_{AB}^{-1} - P_{AA} Z_B \delta_{AB} - \\ & P_{BB} Z_A \delta_{BA} + P_{AA} P_{BB} \delta_{AB}) \end{aligned} \quad (34)$$

3.1.6. Wahl der Parameter

Neben den Koordinaten werden in der CNDO-Rechnung die Basisorbitale, die effektiven Kernladungszahlen Z_A und Parameter für die Größen $U_{\mu\mu}$, β_A^0 und δ_{AB} benötigt.

Tabelle 4 gibt die Koordinaten für das Betain B, das Kation K und das Dikation D in $\text{\AA}$ wieder. Die Numerierung bezieht sich auf die nebenstehende Zeichnung, "0" ist die Ordnungszahl. Die Koordinaten sind bestimmt unter Benutzung der von Sutton /95/ angegebenen Winkel und Abstände sowie der Annahme, daß die Atome des Phenanthridingerüsts und alle unmittelbar benachbarten Atome in der X-Y-Ebene liegen. Der Phenylring liegt dann in der Y-Z-Ebene.

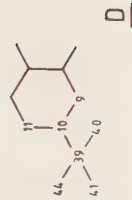
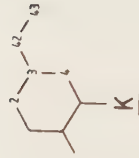
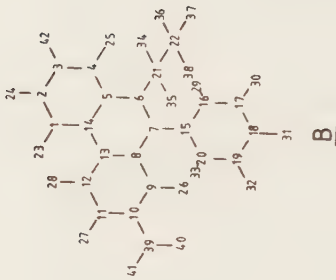
Die Basisorbitale sind vom Slater-Typ /96/. Sie hängen von der Hauptquantenzahl n und dem Orbitalexponenten ζ ab. Sie lauten:

$$\psi(H, 1s) = \left(\frac{\zeta^3}{\pi} \right)^{1/2} \exp(-\zeta r) \quad (35)$$

TABELLE 4

Koordinaten des Betains B, Kations K und Dikations D
Erläuterungen im Text

Nr	O	x	y	z	Nr	O	x	y	z
1	6	0.000	2.788	0.000	30	1	0.000	-5.545	2.142
2	6	1.207	3.485	0.000	31	1	0.000	-6.782	0.000
3	6	2.414	2.788	0.000	32	1	0.000	-5.545	-2.142
4	6	2.414	1.394	0.000	33	1	0.000	-3.071	-2.142
5	6	1.207	0.697	0.000	34	1	3.009	-0.719	-0.507
6	7	1.107	-0.639	0.000	35	1	2.133	-2.242	-0.507
7	6	0.000	-1.394	0.000	36	1	2.825	-0.588	1.961
8	6	-1.207	-0.697	0.000	37	1	3.655	-2.104	1.453
9	6	-2.414	-1.394	0.000	38	1	1.928	-2.150	1.961
10	6	-3.622	-0.697	0.000	39	7	-4.895	-1.432	0.000
11	6	-3.622	0.697	0.000	40	1	-4.868	-2.319	-0.451
12	6	-2.414	1.394	0.000	41	1	-5.649	-0.966	-0.451
13	6	-1.207	0.697	0.000	42	8	3.450	3.438	0.000
14	6	0.000	1.394	0.000	Kation K				
15	6	0.000	-2.914	0.000	42	8	3.592	3.468	0.000
16	6	0.000	-3.611	1.207	43	1	3.862	3.624	-0.905
17	6	0.000	-5.005	1.207	Dikation D				
18	6	0.000	-5.702	0.000	39	7	-4.903	-1.436	0.000
19	6	0.000	-5.005	-1.207	40	1	-4.788	-2.340	-0.485
20	6	0.000	-3.611	-1.207	41	1	-5.628	-0.886	-0.485
21	6	2.268	-1.306	0.000	44	1	-5.208	-1.613	0.970
22	6	2.702	-1.556	1.453					
23	1	-0.935	3.328	0.000					
24	1	1.207	4.565	0.000					
25	1	3.350	0.854	0.000					
26	1	-2.414	-2.474	0.000					
27	1	-4.557	1.237	0.000					
28	1	-2.414	2.474	0.000					
29	1	0.000	-3.071	2.142					



$$\psi(C, N, 0; 2s) = \left(\frac{2^5}{3r}\right)^{1/2} r \exp(-\xi r) \quad (36)$$

$$\psi(C, N, 0; 2p_x) = \left(\frac{2^5}{4r}\right)^{1/2} x \exp(-\xi r) \quad (37)$$

$$\psi(C, N, 0; 2p_y) = \left(\frac{2^5}{4r}\right)^{1/2} y \exp(-\xi r) \quad (38)$$

$$\psi(C, N, 0; 2p_z) = \left(\frac{2^5}{4r}\right)^{1/2} z \exp(-\xi r) \quad (39)$$

Die $U_{\mu\mu}$ werden nach /89/ mit der Ionisierungsenergie I_μ und der Elektronenaffinität A_μ verknüpft:

$$U_{\mu\mu} = -\frac{1}{2} (I_\mu + A_\mu) \quad (40)$$

Die β_A^0 sind so gewählt, daß sich für zweiatomige Moleküle die bestmögliche Übereinstimmung zwischen Rechnungen nach dem Root-haan-Hall-Verfahren und dem CNDO-Verfahren ergibt /89/.

Das hier verwendete Rechenprogramm /97/ bestimmt die χ_{AB} nach der Formel von Mataga und Nishimoto /98/ aus den χ_{AA} und den χ_{BB} , nicht jedoch explizit aus den Basisorbitalen. Die χ_{AA} werden aus s-Orbitalen berechnet.

Die Werte für die Parameter sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

TABELLE 5

Die Parameter für die CNDO-Rechnung

A	ξ	$U_{\mu\mu}(s)$	$U_{\mu\mu}(p)$	β_A^0	Z_A
H	1.200	-7.175		-12.0	1
C	1.625	-14.960	-5.805	-17.5	4
N	1.950	-20.485	-8.484	-20.0	5
O	2.275	-27.255	-10.965	-45.0	6

3.1.7. Die Konfigurationswechselwirkung (CI)

Die einfache CNDO-Rechnung ist zur Beschreibung von Elektronenspektren nur schlecht geeignet. Es ist deshalb notwendig, Konfigurationswechselwirkung zu berücksichtigen /93,99/.

Die Zustandsfunktionen ϕ_i werden durch Linearkombination von Konfigurationen χ_p^{-q} dargestellt, die aus den SCF-Orbitalen gebildet werden. Die Verwendung von SCF-Orbitalen zur Konfigurationswechselwirkung wurde zuerst von Pople /100/ angegeben. Die Numerierung der SCF-Orbitale folgt der üblichen Konvention: Das oberste besetzte SCF-Orbital ist durch den Index 1 charakterisiert. Die Folge der Indices 1,2,...,p,.. kennzeichnet Orbitale in Richtung fallender Energie. Die Folge der Indices -1,-2,...,-q,... kennzeichnet Orbitale in Richtung steigender Energie. Durch Anheben eines Elektrons aus einem besetzten Orbital p in ein unbesetztes Orbital -q wird die einfach angeregte Konfiguration χ_p^{-q} oder abgekürzt (p/-q) gebildet. In den Modellrechnungen wurden Konfigurationen aus den 7 obersten Orbitalen p und den 7 niedrigsten Orbitalen -q verwendet.

Zusätzlich haben wir versucht, doppelt angeregte Konfigurationen (p,o/-q,-r) zu berücksichtigen. Die damit berechneten Spektren stimmen mit den experimentellen jedoch weniger gut überein. Die längstwellige Bande sollte nach diesen Rechnungen nahe an der Grenze zum ultraroten Bereich liegen. Es wird darum nicht weiter davon berichtet.

Die Intensität eines Übergangs $\phi_0 \rightarrow \phi_i$ ist durch das Übergangsmoment M_{oi} gegeben.

$$M_{oi} = e \int \phi_0^* M \phi_i dt_1 \dots dt_n \quad (41)$$

$M = \sum_i r_i z_i$ ist der Dipolmomentoperator, r_i der Ortsvektor des i-ten Teilchens mit der Ladung $z_i e$. M_{oi} ist ein Vektor, der über Polarisation und Intensität eines Übergangs Auskunft gibt.

Mit der Oszillatorenstärke f_{oi} ist er verknüpft durch die Beziehung:

$$f_{oi} = 1,085 \times 10^{11} \tilde{\nu}_{oi} |M_{oi}|^2 \quad (42)$$

3.1.8. Ergebnisse der Modellrechnungen

Die berechneten Spektren werden gemeinsam mit den gemessenen in Kapitel 3.3. besprochen. An dieser Stelle soll darauf eingegangen werden, wie die Konfigurationen (p/-q) an den Zustandsfunktionen beteiligt sind und welche Informationen das Rechenverfahren über die Ladungsverteilung im Grundzustand liefert.

Entsprechend Brillouin's Theorem [101] ist am Grundzustand der Moleküle B, K und D nur eine Konfiguration beteiligt. In ihr besetzen die n Elektronen die n/2 energiegünstigsten SCF-Orbitale.

In der CI-Rechnung werden 50 Konfigurationen berücksichtigt. Die Quadrate der Koeffizienten der Linearkombination geben die Beteiligung der einzelnen Konfigurationen an der Zustandsfunktion an. In Tabelle 6 sind für Betain B, Kation K und Dikation D die Koeffizienten c und die Koeffizientenquadrate c^2 der drei wichtigsten Konfigurationen (p/-q) des ersten angeregten Zustands angegeben.

Der erste angeregte Zustand von Betain B und Kation K wird im wesentlichen durch eine Konfiguration, (1/-1), beschrieben. Diese Näherung ist für B besser als für K, wie die Koeffizienten in der jeweils 2. und 3. Reihe zeigen. Für das Dikation D gilt sie nicht mehr. Dies wird noch deutlicher, wenn man die (nicht

angegebenen) Koeffizienten der weiteren Konfigurationen betrachtet. Der nächstkleinere Koeffizient ist für B und K um etwa einen Faktor 10 kleiner als der drittgrößte, beim Dikation D folgen jedoch noch mehrere Koeffizienten gleicher Größenordnung.

TABELLE 6

Beteiligung der drei wichtigsten Konfigurationen
am ersten angeregten Zustand von B, K und D

c	c^2	(p/-q)
Betain B		
-.971904	.944597	(1/-1)
.184838	.034165	(3/-1)
.077519	.006009	(3/-5)
Kation K		
-.965036	.931294	(1/-1)
-.177773	.031603	(2/-3)
-.103691	.010752	(5/-2)
Dikation D		
-.880499	.775278	(1/-1)
.231949	.053800	(3/-1)
.231039	.053370	(7/-2)

Der längstwellige Elektronenübergang ist beim Betain B ein Konfigurationsübergang. Ein Elektron wird aus dem höchsten besetzten SCF-Orbital (1) in das niedrigste unbesetzte SCF-Orbital (-1) angeregt. Damit kann man Information über die Natur des Übergangs aus den Koeffizienten der Atomorbitale in den beiden SCF-Molekülorbitalen gewinnen.

In den SCF-Orbitalen (1) und (-1) haben die Atomorbitale des Sauerstoffs und des Aza-Stickstoffs mit sehr wenigen anderen das größte Gewicht. Tabelle 7 gibt die Koeffizienten getrennt nach Basisfunktionen und die Summe der Koeffizientenquadrate, summiert über alle Orbitale eines Atoms und eines Zustands.

TABELLE 7

Koeffizienten der Atomorbitale von Sauerstoff und Aza-Stickstoff und Summe der Koeffizientenquadrate in den SCF-Orbitalen (1) und (-1)

	N		O	
	(-1)	(1)	(-1)	(1)
2s	-.319610	.113404	.002481	-.003156
2p _x	.203142	.191754	.342658	-.145917
2p _y	.285700	-.091196	.027483	.053515
2p _z	-.262277	-.392484	-.141851	-.509765
Σ	.293825	.211990	.138298	.284026

Betrachtet man die Summe der Koeffizientenquadrate, sieht man, daß bei der Anregung das Gewicht der Sauerstofforbitale insgesamt abnimmt, das der Stickstofforbitale insgesamt zunimmt, wenn auch die Veränderung am Sauerstoff ausgeprägter ist als am Stickstoff. Dies legt nahe, für den längstwelligen Übergang einen merocyanin-ähnlichen Chromophor verantwortlich zu machen.

Nun sind die Vorstellungen über die Mesomerie eigentlich ganz der π -Elektronentheorie verhaftet. Konsequenterweise müßte man dann zur Beantwortung der Frage, ob ein merocyanin-ähnlicher Chromophor für die längstwellige Absorptionsbande verantwortlich ist oder nicht, nur die 2p_z-Atomorbitale heranziehen. Wie Tabelle 7 zeigt, kommt man dann zum gegenteiligen Ergebnis. Neben der Umverteilung der Elektronen zwischen Sauerstoff und Stickstoff findet bei der optischen Anregung zugleich eine Umverteilung der Elektronen zwischen den verschiedenen Orbitalen eines Zentrums statt. Deshalb ist es nicht sinnvoll, im nachhinein das π -Elektronensystem als unabhängig zu betrachten, wenn die Rechnung vorher alle Valenzelektronen berücksichtigt hat.

Aus den Rechnungen kann man also nicht eindeutig auf einen bestimmten Chromophor schließen. Aufschluß in dieser Frage könnte

ein Vergleich der Spektren von Betain A und Betain B geben, denn für das Betain A läßt sich ein solcher merocyanin-ähnlicher Chromophor, wie erwähnt, nicht formulieren. Weil die Synthese des Betains A noch nicht gelungen ist, können zur Zeit nur die berechneten Spektren verglichen werden. Diese sind außerordentlich ähnlich, so daß die Frage nicht abschließend beantwortet werden kann.

Mulliken /102/ hat den Begriff der "gross atomic population" (GAP) eingeführt. GAP gibt an, wieviele der Valenzelektronen an einem bestimmten Zentrum zu finden sind. Es wird also über alle besetzten Orbitale eines Atoms summiert, wobei die Elektronen, die sich im Überlappungsbereich zwischen zwei Zentren befinden, jeweils zur Hälfte den beiden Zentren zugerechnet werden.

In Tabelle 8 sind die Werte der GAP für Betain B, Kation K und Dikation D aufgeführt. Am Sauerstoffatom (42) sind über die 6 Valenzelektronen hinaus, die es ins Molekül eingebracht hat, 0.5868 Elektronen zu finden. Dieser negativen Ladung sollte nach den Vorstellungen, die in eine Strukturformel impliziert werden, eine positive Ladung am Stickstoffatom (6) entsprechen. Dieses Atom bindet aber ebenfalls mehr Elektronen als es mitgebracht hat. Im Vergleich zum Stickstoffatom (39) sind es bei (6) aber deutlich weniger. Durch die Quaternisierung wird das Stickstoffatom nicht tatsächlich positiv geladen, vielmehr nimmt nur die negative Ladung ab.

Den gleichen Effekt sieht man bei der Protonierung des Stickstoffatoms (39) im Dikation D: Die Werte für (6) in B und (39) in D sind sogar absolut sehr ähnlich.

Am deutlichsten lokalisiert ist eine Ladungsänderung am Sauerstoff (42) bei der Protonierung von B, die zu K führt. Hier fängt das Sauerstoffatom allein etwa 20 % der einen Ladung auf, die das Proton einbringt.

TABELLE 8

"gross atomic populations" für Betain B, Kation K
und Dikation D im Grundzustand. Numerierung der
Atome wie in Tabelle 4 (Koordinaten)

Nr.	O	B	K	D
1	6	4.2202	4.0704	4.0639
2	6	3.9149	3.9963	3.9793
3	6	3.8184	3.8603	3.8306
4	6	4.0104	3.9859	3.9722
5	6	3.9852	3.9190	3.9086
6	7	5.2836	5.3218	5.3118
7	6	3.8912	3.7583	3.7453
8	6	3.9336	3.9961	3.9857
9	6	4.1188	4.0113	3.9941
10	6	3.8692	3.9266	3.9619
11	6	4.0692	3.9908	4.0032
12	6	4.0230	4.0549	4.0178
13	6	4.0524	3.9743	3.9579
14	6	3.9123	3.9653	3.9632
15	6	3.9910	4.0253	4.0416
16	6	4.0533	4.0352	4.0385
17	6	4.0533	4.0515	4.0459
18	6	4.0467	4.0286	4.0185
19	6	4.0530	4.0514	4.0451
20	6	4.0550	4.0378	4.0400
21	6	3.9936	3.9855	3.9841
22	6	4.1484	4.1431	4.1385
23	1	0.9184	0.9013	0.8998
24	1	0.9436	0.9066	0.8879
25	1	0.9560	0.9170	0.9014
26	1	0.9200	0.9113	0.8995
27	1	0.9159	0.8981	0.8909
28	1	0.9161	0.9050	0.8771
29	1	0.9255	0.9270	0.9285
30	1	0.9219	0.9065	0.8945
31	1	0.9274	0.9093	0.8945
32	1	0.9222	0.9068	0.8952
33	1	0.9266	0.9282	0.9287
34	1	0.8898	0.9016	0.8931
35	1	0.9321	0.9146	0.9095
36	1	0.9215	0.9308	0.9288
37	1	0.9406	0.9258	0.9122
38	1	0.9458	0.9348	0.9376
39	7	5.4250	5.4039	5.2829
40	1	0.8353	0.8242	0.6941
41	1	0.8320	0.8198	0.6881
42	8	6.5868	6.3925	6.3825
43	1		0.7442	0.7355
44	1			0.6876

Insgesamt werden die Ladungen, die die Heteroatome auf sich ziehen, von den unmittelbar benachbarten Kohlenstoffatomen und von allen Wasserstoffatomen abgezogen. Dabei geben die Wasserstoffatome leichter Elektronen ab. Die Aminogruppe ist mit N (39) an C (10) gebunden. Wird sie protoniert, fällt GAP an C (10) nicht ab, sondern sie steigt. Dafür verarmen die Wasserstoffatome (40, 41, 44) besonders stark an Elektronen.

Noch eine Bemerkung zur GAP der Wasserstoffatome: Protonen sind im Rahmen dieser Rechnungen erst als sauer anzusehen, wenn ihre GAP unter etwa 0.75 liegt.

In allen diesen Aspekten zeigt sich, daß das gesamte Molekül auf Veränderungen reagiert, die an einer bestimmten Stelle eintreten. Betrachtet man das π -Elektronensystem im Sinne einer σ/π -Separation getrennt vom σ -System, ist festzustellen, daß das σ -System die Effekte, die sich zunächst auf das π -System auswirken, zum großen Teil kompensiert.

Vielleicht sehen wir hier ein allgemeineres Prinzip: Je genauer Rechnungen den physikalischen Gegebenheiten explizit entsprechen, desto genauer wird zwar die Beschreibung des gesamten Moleküls, um so mehr gehen aber die anschaulichen Vorstellungen verloren.

3.2. Zur Polarisationsgradspektroskopie

3.2.1. Grundlagen des Verfahrens

Den elektrischen Dipolübergängen, die an organischen Molekülen zu beobachten sind, lassen sich Übergangsmomente mit definierter Orientierung im Molekül zuordnen. Licht kann von Molekülen nur absorbiert werden, wenn Übergangsmoment und elektrischer Feldvektor des Lichts wenigstens eine gemeinsame Komponente haben. Analog sind bei Lichtemission E-Vektor und Übergangsmoment parallel.

In festen Lösungen sind Moleküle im allgemeinen isotrop verteilt. Sie können sich während der Zeitspanne des Absorptions- und Emissionsprozesses nicht neu orientieren. Strahlt man in eine feste Lösung linear polarisiertes Licht ein, wählt es aus der isotropen Gesamtheit die zur optischen Anregung geeignet orientierten Moleküle aus.

Die Emission erfolgt in der Regel aus dem ersten angeregten Zustand. Mißt man den Winkel zwischen den Schwingungsebenen des absorbierten und des emittierten Lichts, erhält man Auskunft über die relative Orientierung von Emissions- und Absorptionsoszillator.

Einen Übersichtsartikel über die Spektroskopie mit polarisiertem Licht gibt Dörr /103/.

3.2.2. Begriffe und Gleichungen

Als quantitatives Maß für die Anisotropie der Lumineszenzpolarisierung dient der Polarisationsgrad P /104/, der als Funktion der Wellenzahl gemessen wird:

$$P = \frac{I_p - I_s}{I_p + I_s} = \frac{1 - \rho}{1 + \rho}$$

I_p ist die Intensität des Lumineszenzlichts parallel zum Feldvektor des Erregerlichts, I_s die Intensität senkrecht dazu.

$\rho = I_s/I_p$ ist der Depolarisationsgrad.

Der Polarisationsgrad hängt vom Winkel α zwischen den Übergangsmomenten der Emission und der Absorption ab. Die Werte des Polarisationsgrads können theoretisch berechnet werden /105/. Besitzen die Moleküle neben anderen Symmetrieelementen höchstens zweizählige Drehachsen, gilt:

$$P = \frac{3 \cos^2 \alpha - 1}{\cos^2 \alpha + 3}$$

Dann sind die Grenzwerte $P = 0.5$ für parallele Orientierung der beiden Übergangsmomente und $P = -0.33$ für senkrechte Orientierung zueinander /106/.

Experimentell werden diese Grenzwerte oft wegen verschiedener Depolarisationsmechanismen nicht erreicht. Deshalb wird weniger der Absolutbetrag des Polarisationsgrads, sondern seine Änderung mit der Wellenzahl diskutiert.

Für jeden Lumineszenztyp lassen sich zwei verschiedene Arten von Polarisationsgradspektren aufnehmen. Zur Messung des Absorptionpolarisationsgradspektrums beobachtet man den Polarisationsgrad des Emissionslichts bei konstanter Wellenzahl, während die Wellenzahl des Erregerlichts variiert wird. Man erhält das Absorptionpolarisationsgradspektrum bezogen auf die Fluoreszenz (APF) oder das Absorptionpolarisationsgradspektrum bezogen auf die Phosphoreszenz (APP), je nachdem ob es sich bei der Emission um Fluoreszenz (F) oder Phosphoreszenz (P) handelt.

Zur Messung der Lumineszenzpolarisationsgradspektren wird die Wellenzahl des Erregerlichts konstant gehalten und der Polarisationsgrad des Lumineszenzlichts über den ganzen Bereich der

der Emissionsbande gemessen. Ist die beobachtete Lumineszenz eine Fluoreszenz, erhält man das Fluoreszenzpolarisationsgradspektrum (FP), ist sie eine Phosphoreszenz, erhält man das Phosphoreszenzpolarisationsgradspektrum (PP).

3.2.3. Meßanordnung

Das von Bergmann /107/ beschriebene selbstregistrierende Polarisationspektrometer verwendet als Analysator ein System aus feststehendem und rotierendem Polarisator. Diese Konstruktion ermöglicht die Messung eines Spektrums in kurzen Zeiten, erfordert aber hohe Emissionsintensitäten. Sie ist daher für Untersuchungen am Betain B und seinen protonierten Formen nicht geeignet. Wir haben die Meßanordnung verwandt, die Kräßig /108/ hier schon einmal aufgebaut hatte, und sie mit einem empfindlichen Photonen-zähler ausgerüstet. Mit ihr können die Emissionsspektren und die Polarisationsgradspektren punktweise gemessen werden.

Das Licht einer Xenon-Hochdrucklampe (Zeiss XBO 75W/2) wird von einem Monochromator (Zeiss M4Q III) spektral zerlegt, durch ein Glan-Thompson-Prisma aus Kalkspat linear polarisiert und durch eine Quarzlinse (Suprasil) auf die Probe abgebildet, die sich in einem Tieftemperatureinsatz befindet. Über ein zweites Glan-Thompson-Prisma und eine weitere Quarzlinse gelangt das Emissionslicht zum zweiten Monochromator (Leitz Geradsicht-Spiegel-Monochromator). Das spektral zerlegte Licht fällt auf einen Photomultiplier (EMI 6256 A) und wird mit einem Photonen-zähler (Ortec 5CI) registriert.

Die Emission wird unter einem Winkel von 20° zur Absorption beobachtet, der elektrische Feldvektor des Erregerlichts schwingt

senkrecht zur Tischebene. Der Analysator ist um 90° drehbar, so daß die Intensitäten I_s und I_p gemessen werden können.

Die Eigenpolarisation der Meßanordnung wird durch den Korrekturfaktor $K = I_p^k / I_s^k$ berücksichtigt, der so bestimmt wird: Der Polarisator wird aus dem Strahlengang entfernt und an Stelle der Probe ein Milchglasplättchen und ein Pergamentpapier gebracht. So wird am Ort der Probe völlig depolarisiertes Licht erzeugt. Die so gemessenen wellenzahlabhängigen Intensitätsverhältnisse K , die von 1 abweichen, beruhen auf der Eigenpolarisation der Meßanordnung. Die an der Probe gemessenen Intensitätsverhältnisse I_s^0 / I_p^0 werden zur Ermittlung des wirklichen Polarisationsgrads mit dem Korrekturfaktor multipliziert.

Zur Messung der Emissionsspektren werden Polarisator und Analysator aus dem Strahlengang entfernt. Will man die Phosphoreszenz beobachten, unterbricht man das Erregerlicht mit einem Chopper bestimmter Frequenz. Der Photonen-zähler gestattet wahlweise die Messung während der Dunkelphase, oder während die Moleküle der Probe angeregt werden. Bei Anregung mißt man die Gesamtlumineszenz, während der Dunkelphase nur die Anteile mit größeren Abklingzeiten.

Man muß nicht notwendig den Photonenstrom über die gesamte Dunkelphase messen. Je nachdem wieviel Zeit nach Beginn der Dunkelphase bis zum Beginn der Meßzeit vergeht, werden schnellere und langsamere Emissionsprozesse wenigstens teilweise voneinander getrennt. Der Anteil der Meßzeit an der Dunkelphase ist durch den "duty factor" (DF) gegeben.

Die Experimentellen Ergebnisse werden im nächsten Kapitel dargestellt und diskutiert.

3.3. Experimentelle und berechnete Spektren des Betains B und des Dikations D

3.3.1. Die Protonierungsgleichgewichte in Äthanol

Die in glasartig erstarrtem Äthanol bei der Temperatur des flüssigen Stickstoffs gemessenen Absorptions-, Emissions- und Polarisationsgradspektren des Betains B und seiner konjugierten Säuren sollen mit den berechneten Spektren verglichen werden. Dazu muß man zunächst die Bedingungen feststellen, unter denen die drei Spezies einzeln zu beobachten sind. Wegen der Schwierigkeit der Definition des pH-Werts in nicht-wässrigen Systemen können die pK-Werte nicht von Wasser auf andere Lösungsmittel übertragen werden.

Vergleicht man Spektren des Betains B, die in neutralem Äthanol und in Äthanol, das zusätzlich steigende Anteile gelösten Kaliumhydroxids enthält, gemessen wurden, findet man keine Veränderung. Das gilt für normale Temperatur (25⁰ C) und tiefe Temperatur (-195⁰ C). In Äthanol liegt also das reine Betain B vor.

Fügt man einer Lösung des Betains B in Äthanol steigende Anteile von Salzsäure zu, erfolgt allmählich der Farbumschlag nach gelb, der auch in Wasser Kation K oder Dikation D anzeigt. Die Reaktion ist umkehrbar, man findet jedoch keine isosbestischen Punkte. Offensichtlich sind die Gleichgewichtskonstanten für die Protonierungsgleichgewichte $B \rightleftharpoons K$ und $K \rightleftharpoons D$ in Äthanol sehr ähnlich. Das Kation K kann deshalb nicht allein beobachtet werden.

In einem Gemisch aus 95 % Äthanol und 5 % konzentrierter Salzsäure liegt dann wieder nur eine Spezies vor, denn eine weitere Erhöhung der Säurekonzentration ergibt keine spektrale Veränderung. Der Vergleich des Spektrums, das in Abbildung 21 gepunktet gezeichnet ist, mit den in Wasser gemessenen Spektren,

die in Abbildung 14 wiedergegeben sind, zeigt, daß in dem beschriebenen Äthanol-Salzsäure-Gemisch das Dikation D vorliegt.

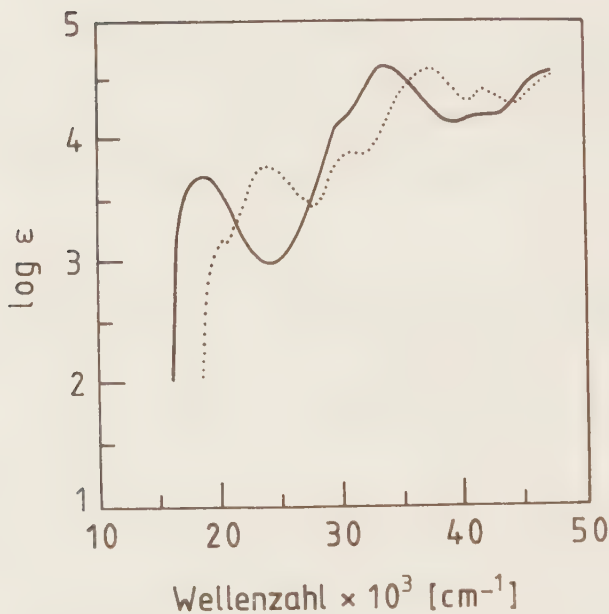


ABBILDUNG 21

Absorptionsspektren des Betains B in Äthanol (—) und des Dikations D in Äthanol/Salzsäure (...) bei 25°C

3.3.2. Spektren des Betains B

In Abbildung 22 sind das Absorptionsspektrum A, das APF-Spektrum, das Fluoreszenzspektrum F und das FP-Spektrum des Betains B wiedergegeben. Alle Spektren wurden in 95 %igem Äthanol bei -195°C gemessen. Das Maximum von F ist willkürlich auf gleiche Höhe mit der längstwelligen Absorptionsbande gesetzt; die relative Intensität wird in logarithmischem Maßstab angegeben. Die 1. Markierung gibt die Wellenzahl im Fluoreszenzspektrum an, die zur Messung des APF-Spektrums verwendet wurde. Die 2. Markierung im Absorptionsspektrum kennzeichnet die Wellenzahl der Fluoreszenzanregung bei der Messung von F und FP. Phosphoreszenz wurde nicht beobachtet.

Im unteren Teil der Abbildung ist das berechnete Strichspektrum aufgezeichnet; angegeben wird der Logarithmus der Oszillatorenstärke über der Wellenzahl. Die Pfeile charakterisieren die Richtung des Übergangsmoments in Bezug auf das Molekülgerüst in der X-Y-Ebene. Übergangsmomente mit merklich von Null verschiedener z-Komponente sind durch "z" unter dem Pfeil gekennzeichnet.

Das A-Spektrum ist in drei Bereiche gegliedert und besitzt zwei ausgeprägte Maxima. Auf der längstwelligen Absorptionsbande (18500 cm^{-1}) ist eine Schwingungsstruktur von 1100 cm^{-1} zu sehen. Weitere diskrete Schwingungsbanden sind nicht zu beobachten. Diese erste Bande ist sehr deutlich vom übrigen Spektrum abgesetzt und durch einen gleichmäßig fallenden Polarisationsgrad im APF gekennzeichnet. Im Bereich der Überlagerung von F und A, bei 17500 cm^{-1} , nimmt der Polarisationsgrad den theoretischen Grenzwert von 0.5 an. Absorptions- und Emissionsoszillator sind identisch und damit parallel. Das berechnete Spektrum zeigt in diesem Bereich eine einzige Bande, deren Übergangsmoment in der Molekülebene liegt und vom Sauerstoffatom (42) auf das Stickstoffatom (6) gerichtet ist.

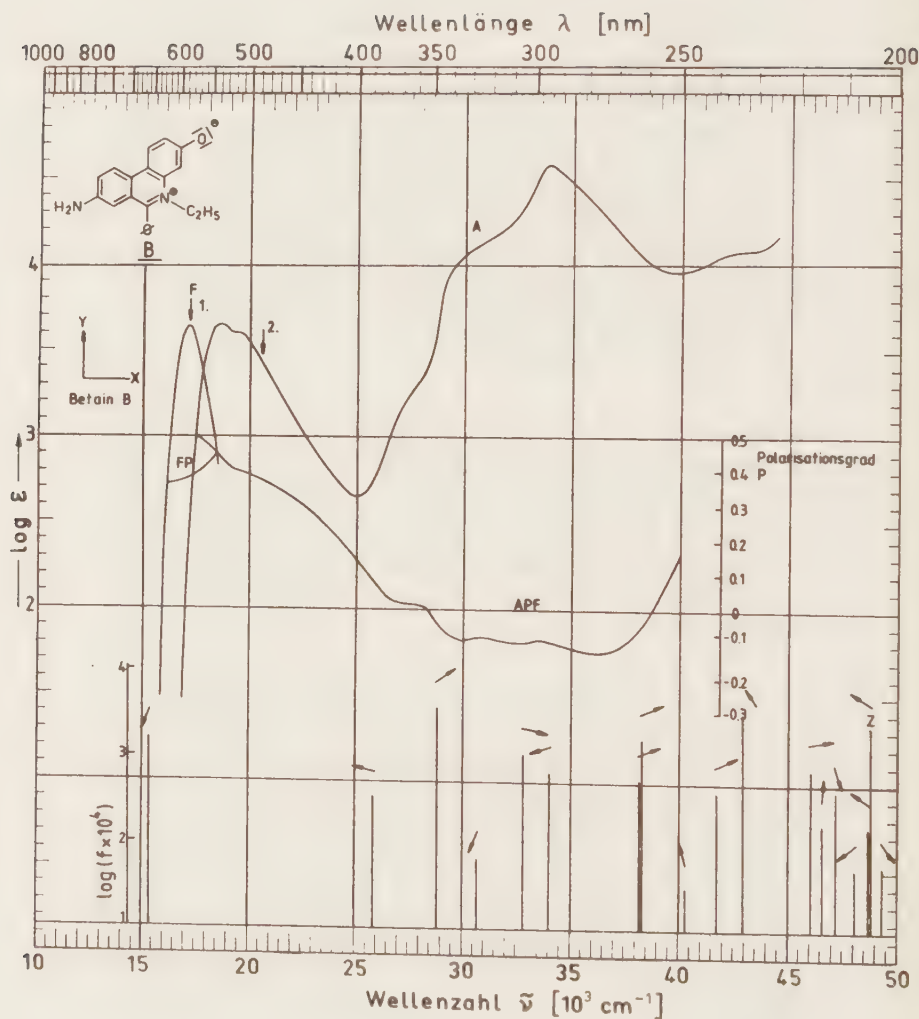


ABBILDUNG 22

Experimentelle und berechnete Spektren des Betains B. Die experimentellen Spektren sind in 95 %igem Äthanol bei -195°C und bei Konzentrationen zwischen $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ und $7 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ gemessen.

Der zweite Bereich liegt zwischen den Minima bei 25000 cm^{-1} und etwa 40000 cm^{-1} . Die Rechnungen lassen 7 Übergänge erwarten, deren Übergangsmomente in der Molekülebene liegen und vorzugsweise Komponenten senkrecht zum Übergangsmoment der Emission haben. Weder im A-Spektrum noch im APF-Spektrum erkennt man diskrete Übergänge. Im A-Spektrum sieht man lediglich eine breite Bande mit Maximum bei 33800 cm^{-1} , die zwei langwellige Schultern aufweist. Im Normaltemperaturspektrum ist die erste Schulter bei 27500 cm^{-1} nicht zu erkennen und die zweite bei etwa 30000 cm^{-1} nur wenig ausgeprägt. Der Polarisationsgrad ist zwischen 27000 cm^{-1} und 38000 cm^{-1} negativ; das entspricht näherungsweise den berechneten Übergangsmomenten.

Der dritte Bereich des A-Spektrums oberhalb 40000 cm^{-1} ist wenig charakteristisch. Das APF-Spektrum konnte aus Intensitätsgründen nicht mehr zuverlässig gemessen werden.

Das F-Spektrum besteht aus einer schmalen Bande mit Maximum bei 17200 cm^{-1} ; der Polarisationsgrad ist mit etwa $P = 0.4$ hoch.

Die Übereinstimmung zwischen berechnetem und experimentellen Spektrum ist befriedigend. Die längstwellige Bande wird bei 15300 cm^{-1} vorausgesagt, während sie in Äthanol etwas kürzerwellig bei 18500 cm^{-1} auftritt. Hier muß man aber die besonderen Eigenschaften des Moleküls berücksichtigen. Betain B ist stark solvatochrom. In Äthanol hat das Molekül eine relativ polare Umgebung. Demgegenüber bezieht sich die Rechnung auf den Gaszustand. Messungen im Gaszustand waren nicht möglich, weil sich das Molekül sehr schwer verdampfen läßt. In unpolaren Lösungsmitteln, die glasartig erstarren –wie etwa in Gemischen aus Methylcyclohexan und Isopentan– ist B sehr schwer löslich. Ein Vergleich mit den Normaltemperaturspektren, die in DMF oder Chloroform gemessen wurden (Abb. 17), ergibt aber eine schon bessere Übereinstimmung zwischen Experiment und Rechnung.

3.3.3. Spektren des Dikations D

Abbildung 23 zeigt A-, F-, P- und die Polarisationsgrad-Spektren des Dikations D. Alle Spektren wurden in einem Gemisch aus 95 % Äthanol und 5 % konzentrierter Salzsäure gemessen. Das Maximum in F wurde willkürlich auf gleiche Höhe mit der längstwelligsten Absorptionsbande gesetzt. Die Phosphoreszenzintensität ist um zwei Größenordnungen kleiner als die Fluoreszenzintensität. (Die Zeichnung gibt die Verhältnisse zugunsten der Übersichtlichkeit nicht richtig wieder.) Das P-Spektrum wurde mit zwei verschiedenen DF-Werten (vgl. 3.2.3.) gemessen. APP und PP beziehen sich auf DF = 70 %. Auf die Bedeutung der Markierungen 1. bis 4. wird im weiteren Text eingegangen. Für die berechneten Spektren gelten die Erläuterungen aus Abschnitt 3.3.2.

Das Absorptionsspektrum des Dikations D ist bei tiefer Temperatur stärker strukturiert als bei normaler Temperatur. Bei tiefer Temperatur ist die Schulter auf dem langwelligsten Ast der längstwelligsten Absorptionsbande, die vermutlich von geringen Anteilen K oder B herrührt, nicht mehr zu sehen. Das langwellige Maximum zeigt eine Schwingungsstruktur von 1100 cm^{-1} . Die gleiche Schwingungsstruktur scheint auch bei der anschließenden Elektronenbande aufzutreten. Es folgen eine breite Bande mit zwei schwachen Schultern und eine schmalere, vergleichbar intensive Bande.

Leider trägt das berechnete Spektrum zur Aufklärung der Banden nicht bei. Das APF-Spektrum unterscheidet den Bereich der ersten Absorptionsbande mit hohem Polarisationsgrad (0.4 - 0.5) vom übrigen Spektrum, in dem der Polarisationsgrad nach steilem Abfall Werte wenig über und unter Null annimmt. Zur Messung des APF-Spektrums wurde die Emission bei 21600 cm^{-1} registriert.

Die Fluoreszenzbande fällt zur kurzwelligen Seite steil ab. Auf der langwelligen Seite ist eine Schulter angedeutet. Sie kann nicht auf die Phosphoreszenz des Moleküls zurückgeführt werden.

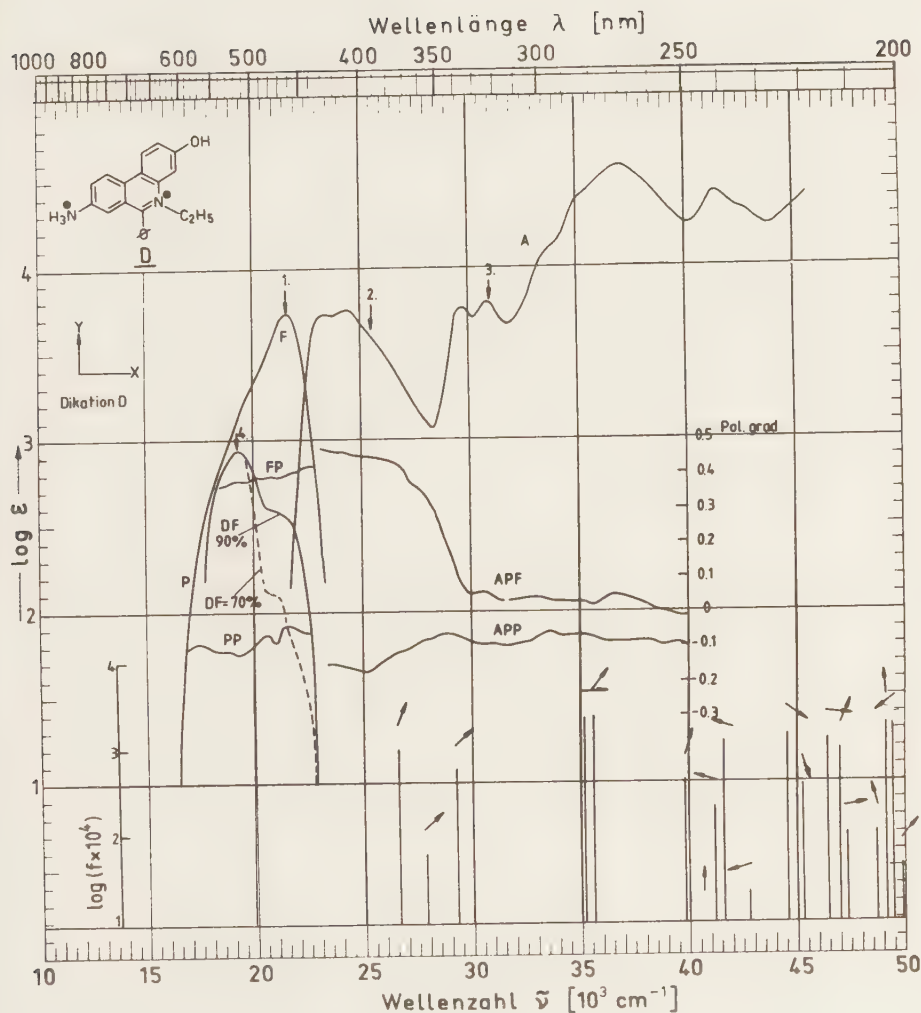


ABBILDUNG 23

Experimentelle und berechnete Spektren des Dikations D. Die experimentellen Spektren sind in Äthanol/Salzsäure (95 %/5 %) bei -195°C und bei Konzentrationen zwischen $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ und $7 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ gemessen.

Zwar hat die Phosphoreszenz hier ihr Maximum, ihre Intensität ist aber im Vergleich zur Fluoreszenzintensität viel zu gering. Der Polarisationsgrad im FP-Spektrum ist annähernd konstant $P = 0.4$. Wie ein Vergleich mit dem PP-Spektrum zeigt, sollte er zur langwelligen Seite stark abnehmen, wenn die Emission dort von der Phosphoreszenz des Moleküls herrührte.

Eine interessante Eigenschaft beobachtet man bei dem Versuch, die Phosphoreszenz des Dikations D zu messen. Mißt man während der Dunkelphase bei verschiedenen DF-Werten, erhält man verschiedene Emissionsspektren. Die Schulter auf der kurzwelligen Seite der "Phosphoreszenz"-Bande nimmt um so mehr ab, je kleiner DF wird. Sie ist unabhängig von der Wellenzahl, bei der die Anregung erfolgt (2. und 3. Marke). Es werden also zwei verschiedene Emissionsprozesse beobachtet, sie können jedoch nicht ganz getrennt werden.

Der eine, langsamer abklingende Prozeß ist die Phosphoreszenz, der andere, schneller abklingende kann als verzögerte Fluoreszenz angesehen werden. Dafür sprechen mehrere Ergebnisse. Die Schulter auf der Phosphoreszenzbande liegt an der Stelle des Maximums der Fluoreszenzbande. Mißt man die PP- und APP-Spektren mit größeren DF-Werten, findet man ein Ansteigen des Polarisationsgrads im PP-Spektrum auf bis zu $P = 0.3$ und im APP-Spektrum auf etwa $P = 0.4$, und zwar jeweils in den Bereichen, in denen diese Werte auch in den FP- und APF-Spektren erreicht werden.

Man könnte die reine Phosphoreszenz messen, wenn es gelänge, den DF-Wert weiter zu erniedrigen. Die geringe Intensität der Phosphoreszenz steht dem entgegen, denn auch die Phosphoreszenz klingt in der Dunkelphase ab. Nach dem Abklingen der verzögerten Fluoreszenz ist die verbleibende Phosphoreszenzintensität nicht mehr meßbar. Bei kleineren DF-Werten als 70 % liegen die Signalintensitäten kaum noch über dem Rauschen der Meßanordnung.

Die wiedergegebenen APP- und PP-Spektren sind bei $DF = 70\%$ gemessen; der Übersichtlichkeit wegen wurden die anderen Spektren hier nur mit Worten beschrieben. Die beiden Spektren geben also im wesentlichen die Phosphoreszenz wieder, verfälscht durch kleine Anteile der Fluoreszenz.

Das APP-Spektrum zeigt durchgehend negative Polarisationsgrade, obwohl sich die Richtung der Übergangsmomente der Absorption stark ändert. Das PP-Spektrum bleibt unbeeinflusst, wenn statt in der ersten, stark positiv polarisierten Absorptionsbande (2. Marke) in der nächsten Bande (3. Marke) angeregt wird, deren Polarisationsgrad nur noch wenig über Null liegt.

Die Übergangsmomente der Absorptionsbanden liegen vorzugsweise in der Molekülebene, sind dort aber in verschiedenen Richtungen orientiert. Da der Polarisationsgrad im APP-Spektrum negativ ist und nur wenig von der Wellenzahl abhängt, muß man folgern, daß das Übergangsmoment der Phosphoreszenz im wesentlichen senkrecht zur Molekülebene orientiert ist. Ähnliche Polarisation des Übergangsmoments der Phosphoreszenz wurde auch bei anderen Heterocyclen beobachtet /109,110/.

4. Anwendung von Betain B in der biologischen Färbung

Das Betain B ist für die biologische Färbung geeignet. Die Abbildungen 24 und 25 sind Photographien von Mäusefibroblasten, die unter verschiedenen Bedingungen fluorochromiert wurden. Unter dem Fluoreszenzmikroskop heben sich die intensiv gelb fluoreszierenden Zellkerne vom dunklen Untergrund prägnant ab. Im äthanolisch gefärbten Präparat sind innerhalb der Kerne mehr und weniger stark gefärbte Bereiche zu unterscheiden.

Die Veränderung des pH-Werts zwischen 6.5 und 8.1 bei der wässrigen Färbung beeinflusst die Farbe der Präparate ebensowenig wie der Wechsel von äthanolischem zu propanolischem Färbebad.

In Alkohol liegt das Betain B vor; in Wasser liegen Betain B und Kation K nebeneinander vor, das Konzentrationsverhältnis ändert sich mit dem pH. In allen Fällen beobachtet man, daß der Farbstoff spezifisch an Nukleinsäure gebunden wird und in gebundenem Zustand gelb fluoresziert. Die Farbe der Fluoreszenz läßt auf eine protonierte Spezies schließen. In Anbetracht des pH-Werts in biologischen Systemen kann es sich nur um das Kation K handeln.

Dies steht in Übereinstimmung mit Untersuchungen an 3,8-Diamino-6-phenyl-phenanthridin, DPP, und seiner konjugierten Säure, dem am Aza-Stickstoff protonierten DPPH^+ /28/. Nur DPPH^+ wird an DNA gebunden. Die positive Ladung des Farbstoffmoleküls ist für die Bindung an Nukleinsäure notwendig.

Das Kation K bildet sich in Äthanol erst bei relativ hoher H^+ -Ionenkonzentration. Trotzdem bindet Nukleinsäure auch aus äthanolischer Lösung das Kation K und nicht das Betain B. Protonierungsreaktion und Bindungsreaktion sind gekoppelt. Die Bindung zwischen Kation K und Nukleinsäure ermöglicht die Protonierung des Betains B unter Bedingungen, unter denen sie in zellfreien Systemen nicht abläuft. Maßgeblich ist die freie Enthalpie der Gesamtreaktion aus Protonierung und Bindung des Farbstoffs.

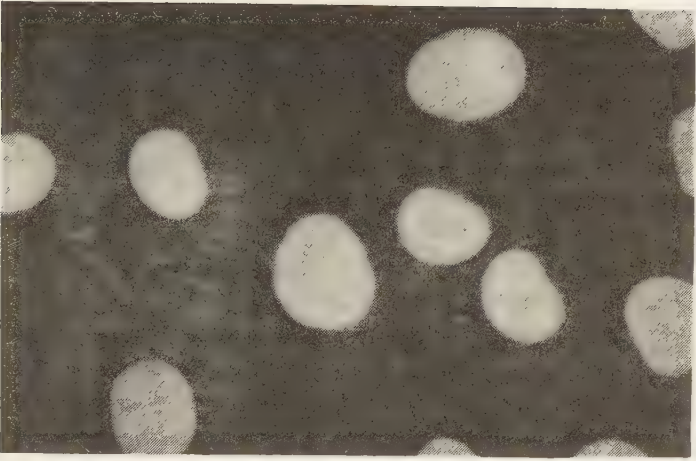


ABBILDUNG 24

Fluorochromierte Mäusefibroblasten, Stamm A 9, 4 Tage alt. 10^{-3} molare Farbstofflösung in Citrat-Phosphat-Puffer, pH = 7. Anregungsfilter B/570, Belichtung 7'', Objektiv 40x, Vergrößerung 400x. Kodak Etachrome 400

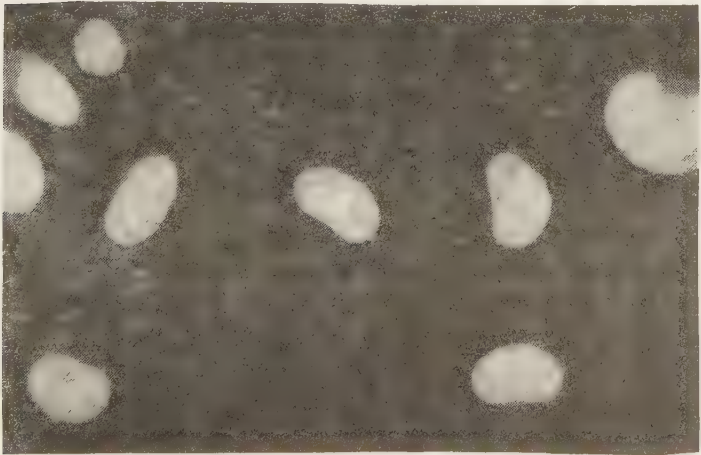


ABBILDUNG 25

Fluorochromierte Mäusefibroblasten, Stamm A 9, 4 Tage alt. 10^{-3} molare Farbstofflösung in Äthanol. Eingedeckt in Entellan. Anregungsfilter B/570, Belichtung 30'', Objektiv 40x, Vergrößerung 400x. Kodak Etachrome 400

5. Experimenteller Teil

5.1. Chemische Verbindungen

Die angegebenen Schmelzpunkte sind nicht korrigiert. Werte in Klammern stammen aus der Literatur.

2-Amino-biphenyl

Die Verbindung wurde von der Firma EGA bezogen und vor der Umsetzung aus Äthanol/Wasser umkristallisiert.

2-Amino-4,4'-dinitro-biphenyl

Die Darstellung erfolgte nach der Vorschrift von Finzi und Bellavita /42/.

Ausbeute: 73 %

Schmelzpunkt: 207°C aus Äthylenglykolmonomethyläther (208°C)

2-Benzamido-4,4'-dinitro-biphenyl

Die Darstellung erfolgte nach der Vorschrift von Walls /43/.

Ausbeute: 90 %

Schmelzpunkt 234°C aus Eisessig (234°C)

3,8-Dinitro-6-phenyl-phenanthridin

Variante A: Die Darstellung erfolgte ausgehend von 2-Benzamido-4,4'-dinitro-biphenyl nach der Vorschrift von Walls /44/.

Ausbeute: 45 %

Schmelzpunkt: 273°C aus Äthylenglykolmonomethyläther

Variante B: Nach der Vorschrift von Barber et al. /45/ wurde die Verbindung ohne Isolierung von Zwischenprodukten aus 2-Amino-4,4'-dinitro-biphenyl hergestellt.

Ausbeute: 61 %

Schmelzpunkt: 273°C aus Äthylenglykolmonmethylläther (274°C)

$\text{C}_{19}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_4$ 345,3 g/mol

Ber.: C 66,08 % H 3,21 % N 12,17 %

Gef.: C 66,22 % H 3,29 % N 11,91 %

5-Äthyl-3,8-dinitro-6-phenyl-phenanthridinium-bromid

Variante A: Als Alkylierungsmittel haben wir Diäthylsulfat, Fluorschwefelsäureäthylester und Triäthylxonium-tetrafluoroborat verwandt. Fluorschwefelsäureäthylester wurde in Anlehnung an die Vorschrift von Alder /48/ dargestellt, Triäthylxonium-tetrafluoroborat nach der Vorschrift von Meerwein et al. /49/. 5,1 g (0,015 Mol) 3,8-Dinitro-6-phenyl-phenanthridin werden in 50 ml trockenen Chlorbenzols auf 80°C erhitzt. 0,018 Mol Alkylierungsmittel werden zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 5 Stunden gekocht. Zugabe von Diäthyläther fällt einen gelben Niederschlag. Durch Rühren mit konzentriertem Ammoniak bildet sich die orangerote Pseudobase. Sie wird durch Extraktion mit Diäthyläther vom Edukt getrennt. Die ätherische Lösung wird mit 5 ml Bromwasserstoffsäure kräftig geschüttelt. Es fallen gelbe Kristalle aus. Die Ausbeuten liegen unter 30 %.

Variante B: Dieses Verfahren wurde von J.R.Grèzes in unserem Arbeitskreis ausgearbeitet.-

3 g 3,8-Dinitro-6-phenyl-phenanthridin werden in 60 ml Diäthylsulfat 4 Stunden auf 150°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das Reaktionsgemisch in 1 l Diäthyläther gegossen; gelbe Kristalle fallen aus. Die Aufarbeitung erfolgt wie bei Variante A beschrieben.

Ausbeute: 53 %

$\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_4\text{Br}$ 454,3 g/mol

Ber.: C 55,52 % H 3,55 %

Gef.: C 55,35 % H 3,38 %

3,8-Diamino-5-äthyl-6-phenyl-phenanthridinium-bromid

5-Äthyl-3,8-dinitro-6-phenyl-phenanthridinium-bromid

wird in Äthanol gelöst und über Engelhard-Katalysator (5 % Pd auf Kohlenstoff) mit Wasserstoff bei 25 atü reduziert.

Ausbeute: 95 %

Schmelzpunkt: 247° C aus Methanol/Petroläther (250° C) /51/

$C_{21}H_{20}N_3Br$ 394,3 g/mol

Ber.: C 63,97 % H 5,11 % N 10,66 %

Gef.: C 63,93 % H 5,37 % N 10,06 %

8-Amino-5-äthyl-3-oxido-6-phenyl-phenanthridinium-betain

Die Darstellung von 8-Acetamido-3-amino-5-äthyl-6-phenyl-phenanthridinium-salz lehnt sich an die Vorschrift von Berg /52/ an.

Zu 5 g Ethidiumbromid in 50 ml Wasser werden bei Raumtemperatur 2,5 g Acetanhydrid getropft. Es bildet sich sofort ein orange-roter Niederschlag. Nach einstündigem Rühren wird der Niederschlag filtriert und mit Eiswasser gewaschen. Das Produkt kann ohne weitere Reinigung und Trocknung diazotiert werden.

Der Niederschlag wird in einem Gemisch aus 20 ml 2 n Schwefelsäure und 40 ml Wasser suspendiert. Im Verlauf von 4 Stunden wird eine Lösung von 1,1 g Natriumnitrit in 10 ml Wasser zugetropft. Die klare, gelbe Lösung wird noch 2 Stunden weitergerührt. Die Temperatur wird während der gesamten Reaktionsdauer unter 5° C gehalten.

Die beiden nächsten Schritte sind dem Verfahren ähnlich, das von Horning et al. /57/ angegeben wurde. Zum Reaktionsgemisch wird bei 0° C eine ebenso kalte Lösung von Natriumtetrafluoroborat in Wasser gegeben. Nach kurzer Zeit bildet sich ein feiner, rotbrauner Niederschlag. Das Diazoniumtetrafluoroborat wird filtriert, mit wenig Eiswasser und einem großen Volumen eiskalten Diäthyläthers gewaschen und an der Luft getrocknet. Man erhält 4,9 g.

Zur Bildung des Phenolesters wird das Diazoniumsalz in Eisessig gelöst, der zugleich 1g wasserfreies Natriumacetat enthält. Die Lösung wird 10 Stunden unter Feuchtigkeitsausschluß gekocht. Das Lösungsmittel wird weitgehend abgedampft.

Zur Spaltung der Säureamidgruppe haben wir uns an die Vorschrift von Berg /52/ gehalten.-Der Rückstand wird in 2 n Salzsäure aufgenommen. Die Lösung wird 6 Stunden zum Sieden erhitzt.

Mit Natriumcarbonat wird pH 10 eingestellt. Die Lösung nimmt dunkelrote Farbe an. Mit Chloroform wird das Betain B aus der wässrigen Phase extrahiert. Die Extrakte werden auf ein kleines Volumen eingengt und mit Natriumcarbonat getrocknet. Nach dem Filtrieren wird das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft. Das Betain B fällt in schwarz-glänzenden Plättchen aus. Die Ausbeute an Rohprodukt beträgt 1,3 g, das entspricht 34 % der Theorie. Das Betain B wird säulenchromatographisch gereinigt. Als stationäre Phase verwandten wir Kieselgel (Merck, Typ 60), als Laufmittel ein Gemisch aus n-Butanol, Wasser und Eisessig im Verhältnis 50:25:15. Das Massenverhältnis Kieselgel zu Betain B sollte 1000:1 betragen. Es hat sich bewährt, jeweils nur 50 mg Betain B auf einer Säule zu reinigen.

Im erwähnten Laufmittelgemisch liegt nicht das Betain B, sondern das Kation K vor. Das Betain B wird wie beschrieben durch Extraktion mit Chloroform aus alkalischer Lösung wiedergewonnen.

Zur Entfernung von Alkoholen wird eine gesättigte Lösung des Betains B in Chloroform unter kräftigem Rühren in die zweihundertfache Menge trockenen Diäthyläthers gegossen. Die blauen Kristalle werden mehrere Tage bei 120° C und 10⁻⁶ Torr getrocknet. Die Substanz enthält zwei Moleküle Kristallwasser.

Ausbeute: 22 % entsprechend 0,920 g

Schmelzpunkt: 195° C unter Zersetzung

$C_{21}H_{18}N_2O \times 2 H_2O$ 350,4 g/mol

Ber.: C 71,98 % H 6,33 % N 7,99 %

Gef.: C 72,12 % H 6,37 % N 7,79 %

DC: R_F-Wert (Kation K) 0,5; es sind keine Verunreinigungen zu erkennen. Laufmittel ist n-Butanol/Eisessig/Wasser = 50/15/25, DC-Fertigplatte Kieselgel 60, F 254, Merck

5-Äthyl-3,8-dicarbäthoxyamino-6-phenyl-phenanthridinium-bromid

Die Darstellung von 8-Acetamido-5-äthyl-3-carbäthoxyamino-6-phenyl-phenanthridinium-bromid in Anlehnung an die Vorschrift von Caldwell und Walls /83/ war beabsichtigt. Statt dessen bildet sich unter den nachfolgend beschriebenen Reaktionsbedingungen Dicarbäthoxyethidiumbromid.

Ethidiumbromid wird wie beschrieben acetyliert. Der Niederschlag von 3-Amino-8-acetamido-5-äthyl-6-phenyl-phenanthridinium-bromid wird sorgfältig getrocknet und dann in siedendem Pyridin suspendiert. An Stelle des trockenen Pyridins kann auch wasserfreies Äthanol eingesetzt werden. Dann wird zur Bindung der bei der Reaktion entstehenden Säure Triäthylamin oder Diäthylanilin im Molverhältnis 1:1,2 zugegeben.

In die siedende Suspension wird Chlorameisensäureäthylester getropft. Wenn die heftige Reaktion abgeklungen ist, wird noch eine halbe Stunde in der Siedehitze gerührt. Zur Trennung vom Edukt wird heiß filtriert. Aus dem Filtrat fällt beim Abkühlen ein gelber Niederschlag von Dicarbäthoxyethidiumbromid.

5.2. Lösungsmittel

Für die Messungen zur Solvatochromie des Betains B wurden folgende Lösungsmittel verwandt:

n-Heptanol, n-Oktanol und n-Nonanol stammten von der Firma Fluka und trugen die Qualitätsbezeichnung "puriss."

n-Propanol, n-Butanol und Äthylenglykolmonomethyläther waren Reagenzien "zur Analyse" der Firma Merck.

Alle anderen Lösungsmittel waren "Uvasole" der Firma Merck. Wasser bedeutet in diesem Zusammenhang Citrat-Borat-Phosphat-Pufferlösung von pH 9.

Der Puffer wurde auch in den Experimenten zur Bestimmung des pK-Werts verwandt. Zur Herstellung des Puffers nach der Vorschrift von Teorell und Stenhagen /69/ benutzten wir p.a.-Produkte der Firma Merck und bidestilliertes Wasser.

Deuterotrifluoressigsäure und Perdeuterodimethylsulfoxid wurden von Merck, Sharp und Dohme bezogen.

Für die Tieftemperaturmessungen wurde das Betain B in Äthanol "für die Fluoreszenzspektroskopie" der Firma Merck gelöst. Das Verhältnis der Volumina $V_{-196^{\circ}} / V_{25^{\circ}}$ wurde in einer kalibrier-ten Kapillare bestimmt. Es beträgt 0,807.

Für das Dikation D wurde ein Lösungsmittelgemisch aus 95 Volumen- prozent absolutem Äthanol und 5 Volumenprozent konzentrierter Salzsäure p.a. hergestellt. Beide Reagenzien lieferte Merck.

Das Gemisch zeigt keine störenden Absorptionen oder Emissionen zwischen 15000 cm^{-1} und 45000 cm^{-1} . Das Verhältnis der Volumina $V_{-196^{\circ}} / V_{25^{\circ}}$ beträgt ebenfalls 0,807.

5.3. pH-Messungen

Die pH-Werte wurden mit einem pH-Meter der Firma Knick und einer Einstabsmeßzelle HA 405-60 der Firma Ingold gemessen. Die Eichung erfolgte mit Eichlösungen der Firma Schott/Mainz.

5.4. Messung der Absorptionsspektren

Die Absorptionsspektren bei 25°C wurden mit dem selbstregis- trierenden Spektrometer DMR 21 von Zeiss aufgenommen. Die spek- troskopische Ermittlung des pK-Werts und die Messung der Ab- sorptionsspektren bei -196°C erfolgte mit dem Spektrometer PMQ II von Zeiss.

Die Meßanordnung zur Aufnahme der Emissions- und Polarisations- gradspektren ist in Abschnitt 3.2.3. beschrieben.

5.5. NMR-Spektrometer

Die Protonenresonanzspektren wurden mit folgenden Geräten aufge- nommen: EM 390 von Varian (90 MHz), WM 250 (250 MHz) und WH 360 (360 MHz) von Bruker.

5.6. Messung des Massenspektrums

Das Massenspektrum wurde mit einem Massenspektrometer VG Micro-mass 7070 F bei 200⁰ C und einer Elektronenenergie von 70 eV aufgenommen.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird über Synthese und Reinigung von 8-Amino-5-äthyl-3-oxido-6-phenyl-phenanthridinium-betain, Betain B, berichtet. Das Betain B wurde dargestellt, weil seine Ähnlichkeit mit Ethidiumbromid und seine polare Struktur neben einem ausgeprägten solvatochromen Effekt Eigenschaften erwarten lassen, die es zu differenzierender biologischer Färbung geeignet machen.

Die Synthese geht vom 2-Amino-biphenyl aus und ist in drei wesentliche Etappen gegliedert: Synthese des Phenanthridingerüsts, Synthese von Ethidiumbromid und Ersatz der Aminogruppe durch die Hydroxygruppe. Die Einführung der Hydroxygruppe gelingt nicht durch direkte Verkochung des diazotierten Amins, sondern nur durch Spaltung des entsprechenden Phenolesters, der aus dem isolierten Diazoniumtetrafluoroborat in wasserfreiem Medium dargestellt werden kann.

Die Struktur des Betains B wird durch Elementaranalyse, Massenspektrum und ^1H -NMR-Spektrum gesichert.

Das Betain B liegt in Wasser in einem pH-abhängigen Gleichgewicht mit seinem konjugierten Phenol, Kation K, und dem zweifach protonierten Dikation D vor. Die Absorptionsspektren der drei Spezies in Wasser werden angegeben. Der pK_a -Wert für das Gleichgewicht zwischen Betain B und Kation K bei 25°C wird spektralphotometrisch zu 7.15 ± 0.04 bestimmt.

Das Betain B ist solvatochrom. Das längstwellige Absorptionsmaximum liegt in Wasser bei 20000 cm^{-1} , in DMSO bei 16300 cm^{-1} . Die Spektren in 18 Lösungsmitteln werden beschrieben. B unterscheidet amphiprotonische und aprotonische Lösungsmittel. Eine Korrelation zwischen Lage der längstwelligen Absorptionsbande und makroskopischen Lösungsmittleigenschaften ist nicht möglich. In hydroxylhaltigen Lösungsmitteln ist B gegen Licht beständig, in den anderen bleicht es schnell aus.

Absorptions-, Emissions- und Polarisationsgrad-Spektren von Betain B und Dikation D in glasartig erstarrtem Äthanol bei 77⁰ K werden angegeben. D zeigt neben der Phosphoreszenz eine verzögerte Fluoreszenz.

Die Elektronenübergänge und ihre Polarisation werden mit einem All-Valenz-Elektronen-CNDO-CI-Näherungsverfahren berechnet. Berechnete und experimentelle Spektren werden verglichen. Das Rechenverfahren beschreibt die Spektren des Betains B besser als die des Dikations D.

Das Betain B ist zur biologischen Färbung geeignet. Es wird in Gestalt des Kations K spezifisch an Nukleinsäure gebunden. Das in den Zellkernen von Mäusefibroblasten gebundene Kation K fluoresziert intensiv mit gelber Farbe.

7. Literaturverzeichnis

- 1 G.T.Morgan, L.P.Walls J.Chem.Soc. 2447 (1931)
- 2 C.H.Browning, G.T.Morgan, J.V.M.Robb, L.P.Walls
J.Pathol.Bacteriol. 46 203 (1938)
- 3 A.Albert, S.D.Rubbo, M.I.Burvill Brit.J.Exp.Pathol.
30 159 (1949)
- 4 B.A.Newton Advan.Chemother. 1 35 (1964)
- 5 L.P.Walls J.Chem.Soc. 294 (1945)
- 6 L.P.Walls J.Chem.Soc 188 (1948)
- 7 L.P.Walls J.Soc.Chem.Ind. 66 182 (1947)
- 8 C.H.Browning, K.M.Calver, M.W.Leckie, L.P.Walls
Nature 167 263 (1946)
- 9 R.Wien Brit.J.Pharmacol.Chemotherapy 1 65 (1946)
- 10 W.Fuller, M.J.Waring Ber.Bunsenges.Phys.Chem. 68 805 (1964)
- 11 M.J.Waring J.Mol.Biol. 13 269 (1965)
- 12 M.J.Waring Mol.Pharmacol. 1 1 (1965)
- 13 M.J.Waring J.Mol.Biol. 54 247 (1970)
- 14 W.Bauer, J.Vinograd J.Mol.Biol. 33 141 (1968)
- 15 J.L.Bresloff, D.M.Crothers J.Mol.Biol. 95 103 (1975)
- 16 M.LeBret, J.B.LePecq, J.Barbet, B.P.Roques
Nucl.Acids Res. 4 1361 (1977)
- 17 J.B.LePecq, C.Paoletti J.Mol.Biol. 27 87 (1967)
- 18 J.Paoletti, J.B.LePecq J.Mol.Biol. 59 43 (1971)
- 19 C.C.Tsai, S.S.Jain, H.M.Sobell
Proc.Natl.Acad.Sci., U.S.A. 72 628 (1975)
- 20 J.Pauluhn, H.W.Zimmermann Ber.Bunsenges.Phys.Chem.
82 1265 (1978)
- 21 L.S.Lerman J.Mol.Biol. 3 18 (1961)
- 22 L.S.Lerman Proc.Natl.Acad.Sci., U.S.A. 49 94 (1963)
- 23 M.J.Waring Chemistry and Industry 1 105 (1975)
- 24 C.C.Tsai, S.C.Jain, H.M.Sobell J.Mol.Biol. 114 301 (1977)
- 25 A.L.Stone, D.F.Bradley JACS 83 3627 (1961)
- 26 D.F.Bradley, M.K.Wolf Proc.Natl.Acad.Sci., U.S.A. 45 944 (1959)
- 27 J.Pauluhn, J.R.Grezes, H.W.Zimmermann
Ber.Bunsenges.Phys.Chem. 83 708 (1979)

- 28 J.Pauluhn, H.W.Zimmermann Ber.Bunsenges.Phys.Chem.
83 76 (1979)
- 29 W.Göhde in: "Fluorescence Techniques in Cell Biology"
(A.A.Thauer, M.Stern, ed.) Springer-Verlag, Berlin
Heidelberg New York, 1973
- 30 L.G.S.Brooker et al. JACS 73 5350 (1951)
- 31 E.M.Kosower JACS 80 3253 (1958)
- 32 Ch.Reichardt, K.Dimroth Fortschr.chem.Forsch. 11 1 (1968)
Ch.Reichardt Angew.Chem. 91 119 (1979)
- 33 W.Liptay Z.Naturforschg. 20a 1441 (1965)
- 34 W.Liptay Z.Naturforschg. 21a 1605 (1966)
- 35 W.Liptay Angew.Chem. 81 195 (1969)
- 36 L.G.S.Brooker Chimia 15 87 (1961)
- 37 K.Dimroth et al. Liebigs Ann.Chem. 661 1 (1963)
- 38 H.Göldi Dissertation, Basel, 1971
- 39 F.C.Copp, L.P.Walls J.Chem.Soc. 311 (1950)
- 40 L.P.Walls in: "Heterocyclic Compounds" (R.C.Elderfield, ed.),
Vol. 4, Wiley, New York, 1952
- 41 B.R.T.Keene, P.Tissington in: "Advances in Heterocyclic
Chemistry" (A.R.Katritzky, A.J.Boulton, ed.), Vol. 13,
Academic Press, New York, 1971
- 42 C.Finzi, V.Bellavita Gazzetta.Chim.Ital. 68 77 (1938)
- 43 L.P.Walls J.Chem.Soc. 3511 (1950)
- 44 L.P.Walls J.Chem.Soc. 294 (1945)
- 45 H.J.Barber et al. J.Soc.Chem.Ind., London 69 82 (1950)
- 46 M.R.Acheson, G.J.Bond J.Chem.Soc. 246 (1956)
T.I.Watkins J.Chem.Soc. 1443 (1958)
- 47 B.L.Hollingsworth, V.Petrov J.Chem.Soc. 3664 (1961)
- 48 R.W.Alder Chemistry and Industry 983 (1973)
- 49 H.Meerwein et al. J.prakt.Chem/2/ 154 83 (1940)
Organic Synthesis, Coll.Vol. V, 1080, Wiley, New York, 1973
- 50 J.R.Grèzes, private Mitteilung
- 51 T.I.Watkins J.Chem.Soc. 3059 (1952)
- 52 S.S.Berg J.Chem.Soc. 3635 (1963)
- 53 Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie (E.Müller, ed.)
X/3 S. 7ff, VI/1 S.247ff, G.Thieme-Verlag, Stuttgart, 1976

- 54 J.P.Lambooy JACS 72 5327 (1950)
- 55 W.J.Gottstein et al. J.Org.Chem. 29 3065 (1964)
- 56 A.H.Lewin, T.Cohen J.Org.Chem. 32 3844 (1967)
- 57 D.E.Horning, D.A.Ross, J.M.Muchowsky Can.J.Chem. 51 2347 (1973)
- 58 Z.E.Jolles in: "Chemistry of Carbon Compounds" (E.H.Rodd, ed.)
Vol. III A S.293, Elsevier, Amsterdam, 1954
- 59 R.M.Silverstein, G.C.Bassler "Spectrometric Identification
of Organic Compounds", 2. Edit., s.143, Wiley, New York 1967
- 60 W.Seiffert, unveröffentlichte Ergebnisse
- 61 G.Thomas, B.Roques FEBS Letters 26 169 (1972)
- 62 D.J.Patel, L.L.Canuel Proc.Natl.Acad.Sci., U.S.A.
73 3343 (1976)
- 63 M.Liebman, J.Rubin, M.Sundaralingam Proc.Natl.Acad.Sci.,
U.S.A. 74 4821 (1977)
- 64 P.N.Rylander et al. JACS 85 2723 (1963)
- 65 G.Spitteller, M.Spitteller-Friedmann Monatsh. 93 1395 (1962)
- 66 T.Aczel, H.E.Lumpstein Anal.Chem. 32 1819 (1960)
- 67 J.H.Beynon, R.A.Saunders, A.E.Williams "The Mass Spectra
of Organic Molecules", Ss.153, 203, Elsevier, Amsterdam, 1968
- 68 loc. cit. /67/, S. 79
- 69 T.Teorell, E.Stenhagen Biochem.Z. 299 416 (1938)
- 70 Handbook of Chemistry and Physics, (R.C.Weast, ed.)
51. Auflage, Cleveland, 1970
- 71 A.Albert, E.P.Serjeant "The Determination of Ionization
Constants", Chapman & Hall, London, 1971
- 72 E.Lippert, F.Moll Z.Elektrochem. 58 718 (1954)
- 73 E.Lippert Z.Naturforsch. 10a 541 (1955)
- 74 K.Dimroth Chimia 15 80 (1961)
- 75 L.Onsager JACS 58 1486 (1936)
- 76 Y.Ooshika J.Phys.Soc.Jap. 9 594 (1954)
- 77 A.T.Amos, B.L.Burrows Theoret.Chim.Acta 29 139 (1973)
- 78 G.Klopman Chem.Phys.Lett. 1 200 (1967)
- 79 H.A.Germer Theoret.Chim.Acta 34 145 (1974)
- 80 H.C.Longuet-Higgins, J.A.Pople J.Chem.Phys. 27 192 (1957)
- 81 Ch.Reichardt "Lösungsmittleffekte in der organischen
Chemie", 2.Auflage, S.31, Verlag Chemie, Weinheim, 1973

- 82 W.Seiffert, J.R.Grèzes, private Mitteilung
- 83 A.G.Caldwell, L.P.Walls J.Chem.Soc. 188 (1948)
- 84 I.Zimmermann, H.W.Zimmermann Z.Naturforsch. 31c 656 (1976)
- 85 D.E.Graves et al. BBA 479 98 (1977)
- 86 J.A.Pople, D.P.Santray, G.A.Segal J.Chem.Phys. 43 S129 (1965)
- 87 J.A.Pople, G.A.Segal J.Chem.Phys. 43 S136 (1965)
- 88 J.A.Pople, G.A.Segal J.Chem.Phys. 44 3289 (1966)
- 89 J.A.Pople, D.L.Beveridge "Approximate Molecular Orbital Theory", McGraw-Hill, New York, 1970
- 90 D.R.Hartree "The Calculation of Atomic Structures", John Wiley and Sons, New York, 1957
- 91 C.C.J.Roothaan Rev.Mod.Phys. 23 69 (1951)
- 92 G.G.Hall Proc.Roy.Soc.(London) A205 541 (1951)
- 93 G.Klopman, B.O'Leary Fortsch.chem.Forsch. 15 445 (1970)
- 94 R.G.Parr. J.Chem.Phys. 20 239 (1952)
- 95 L.E.Sutton "Tables of Interatomic Distances and Configurations in Molecules and Ions", Special Publication 18, The Chemical Society, London, 1965
- 96 J.C.Slater Phys.Rev. 36 57 (1930)
- 97 H.Baumann "CNDUV99" Nr. 333, Quantum Chemistry Program Exchange, Indiana, 1975
- 98 N.Mataga, K.Nishimoto Z.Phys.Chem.NF 13 140 (1957)
- 99 J.DelBene, H.H.Jaffe J.Chem.Phys. 48 1807 (1968)
- 100 J.A.Pople, Proc.Phys.Soc.(London) A68 81 (1955)
- 101 P.O.Löwdin Advan.Chem.Phys. 2 207 (1959)
- 102 R.S.Mulliken J.Chem.Phys. 23 1833 (1955); 23 1841 (1955)
- 103 F.Dörr Angew.Chem. 78 457 (1966)
- 104 P.P.Pheophilow "The Physical Basis of Polarized Emission", Consultants Bureau, New York, 1961
- 105 A.Jablonski Z.Physik 96 236 (1935)
- 106 F.Perrin Ann.Physique 2 169 (1929)
- 107 D.Bergmann, Dissertation, Freiburg, 1976
- 108 R.Kräßig, Diplomarbeit, Freiburg, 1970
- 109 H.U.Schütt, H.W.Zimmermann Ber.Bunsenges.Phys.Chem. 67 54 (1963)
- 110 F.Dörr, H.Gropper Angew.Chem. 74 354 (1962)

LEBENS LAUF

Name: Johann-Henrich Finkentey
Geburtstag: 13. Oktober 1949
Geburtsort: Wuppertal-Barmen
Eltern: Dr. rer. pol. Erwin Finkentey und
Elisabeth Finkentey, geb. Bäumer

Zeitlicher Verlauf der Ausbildung

1956 - 1960	Evangelische Volksschule an der Eichenstraße, Wuppertal-Barmen
1960 - 1968	Städtisches altsprachliches Wilhelm-Dörpfeld-Gymnasium, Wuppertal-Elberfeld
24.5.1968	Reifeprüfung
1.10.1968 - 4.12.1968	Wehrdienst
1.4.1969	Beginn des Studiums der Chemie an der Universität Freiburg
16.4.1971	Diplom-Chemiker-Vorprüfung
15.10.1973 - 31.12.1973	wissenschaftliche Hilfskraft
1.4.1974 - 27.11.1974	Diplomarbeit am Institut für Physikalische Chemie I unter Anleitung von Prof. Dr. H. Zimmermann und Doz. Dr. H. Baumgärtel
27.11.1974	Diplom-Chemiker-Hauptprüfung
1.4.1974 - 31.3.1975	wissenschaftliche Hilfskraft
1.4.1975 - 31.3.1977	Stipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetz; Arbeit über Retinalisomere und ihre Schiff'schen Basen.
1.4.1977	Beginn der Arbeit an der vorliegenden Dissertation
1.4.1977 - 31.3.1978	wissenschaftliche Hilfskraft
1.4.1978 - 31.12.1979	wissenschaftlicher Angestellter

